

**Verstärkung der Zelladhärenz und Induktion des Zell-„Spreading“ –
eine neue Funktion von RAGE, einem hoch selektiven
Differenzierungsmarker humaner Alveolar-Typ 1-Zellen**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der
Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Nina Demling

geboren am 10.12.1975 in Bad Neustadt

Gutachter: 1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Gerhard Rödel
 2. Prof. Dr. med. habil. E. Peter Rieber
 3. Prof. Dr. rer. nat. et rer. medic. habil. Heinz Fehrenbach

Tag der Einreichung: 27.04.2005

Tag der Disputation: 08.07.2005

***Meinen Eltern
und
Christopher***

*Würde sich der Mensch niemals irren,
er fände nichts.*

Paul Valéry (franz. Dichter; 1871-1945)

Verzeichnis der wissenschaftlichen Veröffentlichungen

I. Publikationen

Nina Demling, Carsten Ehrhardt, Michael Kasper, Michael Laue, Lilla Knels, Ernst Peter Rieber.

Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells

Cell and Tissue Research 2005; in Revision

II. Tagungsbeiträge

Nina Demling, Carsten Ehrhardt, Michael Kasper, Michael Laue, Kwan-Jin Kim, Lilla Knels, Ernst Peter Rieber.

Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells

Poster. Experimental Biology Meeting 2005, April 01-08, San Diego

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 ENTSTEHUNG UND VORKOMMEN VON „ADVANCED GLYCATION ENDPRODUCTS“ (AGES)	1
1.2 DER REZEPTOR FÜR „ADVANCED GLYCATION ENDPRODUCTS“ (RAGE)	3
1.2.1 Identifizierung von RAGE	3
1.2.2 Aufbau von RAGE	4
1.2.3 Lokalisation von RAGE	6
1.3 DIE LIGANDEN VON RAGE	6
1.3.1 RAGE-AGE-Interaktion	7
1.3.2 RAGE-Amyloid-Interaktion	9
1.3.3 RAGE-S100-Interaktion.....	11
1.3.4 RAGE-Amphoterin-Interaktion.....	13
1.4 AUFBAU DER LUNGE.....	15
1.5 ZIELSETZUNG UND ARBEITSPROGRAMM.....	18
2 MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1 MATERIAL	21
2.1.1 Chemikalien	21
2.1.2 Lösungen und Puffer	21
2.1.3 Kulturmedien	24
2.1.4 Zelllinien	24
2.1.5 Weitere Materialien	25
2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	25
2.2.1 Polymerasekettenreaktion.....	25
2.2.2 Restriktionsverdau von DNA	25
2.2.3 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	26
2.2.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen	26
2.2.5 Klonierung von PCR-Produkten	26
2.2.5.1 Klonierung von sRAGE	27
2.2.5.2 Klonierung von fIRAGE	27
2.2.6 Transformation von DNA in kompetente Bakterien und Kultivierung.....	28
2.2.7 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	28

2.2.8	Sequenzierung von Nukleinsäuren	29
2.2.9	RNA-Isolierung aus Zellen	30
2.2.10	Reverse Transkription von mRNA.....	30
2.2.11	Quantitative „real time“ RT-PCR	30
2.2.12	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese	32
2.2.13	Western-Blot und immunchemischer Nachweis	33
2.2.13.1	Phospho-p44/42 Nachweis mittels Western Blot	34
2.2.14	Metallchelate-Chromatographie	35
2.2.15	ELISA.....	36
2.2.15.1	ELISA-Antikörper-Screening	36
2.2.15.2	Untersuchung der sRAGE-Liganden-Interaktion.....	37
2.2.15.3	Nachweis der NF κ B-Aktivierung mittels ELISA.....	38
2.2.16	EMSA.....	38
2.2.16.1	Stimulation der Zellen	38
2.2.16.2	Herstellung der Kernextrakte	38
2.2.16.3	Radioaktive Markierung der Oligos	39
2.2.16.4	Bindung der Kernextrakte und native Polyacrylamid- Gelelektrophorese.....	39
2.3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	40
2.3.1	Bestimmung der Zellzahl.....	40
2.3.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	40
2.3.3	Kultivierung und Passagieren von Zelllinien.....	40
2.3.4	Transfektion von adhärennten Zelllinien und Generierung stabiler Klone	41
2.3.5	Transduktion von humanen Zelllinien.....	42
2.3.6	Generierung monoklonaler Antikörper	43
2.3.7	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	44
2.3.7.1	Zellbindungsassay	45
2.3.8	Isolation und Kultivierung von Primärzellen.....	45
2.3.8.1	Isolation von HUVEC	45
2.3.8.2	Isolation von peripheren Blutmonozyten über Plastikadherenz	45
2.3.8.3	hAEPc Kultur.....	46
2.3.9	RAGE - Lokalisationsstudien.....	46
2.3.9.1	Gefrierschnitte und „HOPE“ – fixierte Schnitte von humanem Lungengewebe	46

2.3.9.2	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie der hAEPc.....	47
2.3.9.3	Immunogold-Elektronenmikroskopie.....	48
2.3.10	Untersuchung der Adhärenz-Kinetik → CCK-8	48
2.3.11	Untersuchung des „Spreading“-Verhaltens → DIC Mikroskopie	49
3	ERGEBNISSE	50
3.1	HERSTELLUNG VON SRAGE	50
3.2	HERSTELLUNG MONOKLONALER ANTI-RAGE-ANTIKÖRPER	52
3.3	HERSTELLUNG DES FLRAGE-KONSTRUKTS.....	54
3.4	AGE-BINDUNGSASSAY.....	55
3.5	BINDUNG VON S100B AN SRAGE.....	58
3.6	ZELLBINDUNGSASSAYS MIT DIG-MARKIERTEN AGES	59
3.7	NACHWEIS DER AGE-BINDUNG ÜBER ZELLAKTIVIERUNGSSTUDIEN	61
3.8	ZELLAKTIVIERUNG ÜBER QUERVERNETZUNG DES MEMBRANSTÄNDIGEN RAGE	63
3.9	RAGE EXPRESSION IN ENDOTHELZELLEN UND MONOZYTEN (FACS)	65
3.10	RAGE EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN ZELLTYPEN (WESTERN BLOT).....	66
3.11	GEWEBE-VERTEILUNG VON RAGE.....	68
3.12	ZELLULÄRE LOKALISATION VON RAGE IN DER LUNGE.....	71
3.13	RAGE-EXPRESSION WÄHREND DER TRANSDIFFERENZIERUNG VON AT II ZU AT I ZELLEN.....	73
3.14	KGF BEHANDLUNG DER HAEPc	77
3.15	SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON RAGE IN HAEPc ERMITTELT DURCH IMMUNOGOLD-ELEKTRONENMIKROSKOPIE	79
3.16	BESCHLEUNIGTE ADHÄRENZ VON HEK293 FLRAGE AUF KOLLAGEN IV- BESCHICHTETEN KULTURSCHALEN.....	80
3.17	KO-KULTUR VON RAGE-TRANSDUZIERTEN SUSPENSIONSZELLEN MIT NHLF	83
3.18	INTERAKTION VON SRAGE MIT MATRIXPROTEINEN	85
3.19	„SPREADING“ VON HEK293 FLRAGE-TRANSFEKTANTEN AUF KOLLAGEN IV	86
4	DISKUSSION	88
4.1	AGE-RAGE-BINDUNG.....	88
4.1.1	sRAGE	88
4.1.2	AGE-Modifikationen	89
4.1.3	Interaktion von sRAGE mit AGES.....	90
4.1.4	Bindung von AGES an fIRAGE	91

4.1.5	AGE-bedingte Zellaktivierung.....	92
4.1.6	Kritik an der AGE/ RAGE-Hypothese	94
4.2	RAGE-GEWEBEVERTEILUNG.....	95
4.2.1	RAGE-Protein	95
4.2.2	RAGE-Transkripte.....	96
4.3	ZELLULÄRE UND SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON RAGE IN DER LUNGE	97
4.3.1	Lungengefrierschnitte.....	97
4.3.2	Isolierte hAEpC	98
4.4	MÖGLICHE PHYSIOLOGISCHE FUNKTIONEN VON RAGE IN DER LUNGE.....	99
4.4.1	Signaltransduktion.....	99
4.4.2	Transport.....	100
4.4.3	Adhäsion von immunregulatorischen Zellen.....	102
4.4.4	Adhärenz und „Spreading“	103
4.5	AUSBLICK: BEDEUTUNG DER RAGE-VERMITTELTEN ADHÄRENZ UND DES „SPREADING“ FÜR DIE LUNGENFUNKTION.....	106
5	ZUSAMMENFASSUNG	108
6	LITERATURVERZEICHNIS	111
7	ANHANG.....	132

Abkürzungsverzeichnis

A β	beta Amyloid
AGE	„advanced glycation endproduct“
Ak	Antikörper
AS	Aminosäure
AT	Alveolar-Epithelzelle
ATCC	American Type Culture Collection
β 2M	beta-2-Mikroglubulin
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CD	„Cluster of differentiation“
CML	Carboxymethyllysin
CMV	Cytomegalie-Virus
C-terminal	carboxyterminal
Cy3	Indocarbocyanin
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	dominant negativ
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Endothelzelle
ECL	„enhanced chemiluminescence“
EGFP	„enhanced green fluorescence protein“
ELISA	„enzyme linked immunosorbent assay“
EMSA	„electrophoretic mobility shift assay“
EN-RAGE	„extracellular newly identified RAGE binding protein“
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazellulär regulierte Kinase

FACS	„fluorescence activated cell sorter“
FI	Fluoreszenzintensität
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
fl	„full length“, Gesamtlängen-
FPLC	„fast protein liquid chromatography“
g	Zentrifugalbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
h	Stunde
hAEpC	humane Alveolar-Epithelzelle
Hb	Hämoglobin
HMGB1	„high mobility group box 1“
HMVEC-L	humane Mikrovaskuläre Endothelzellen der Lunge
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HUVEC	„human umbilical vein endothelial cells“, humane Endothelzellen aus Nabelschnurblut
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I κ B	Inhibitor des NF κ B
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickoxid-Synthetase
IRES	interne Ribosomenbindungsstelle
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KO	Knock-out
LC	Light Cycler
LDL	„Low Density Lipoprotein“
LEA	<i>Lycopersicon esculentum</i> Agglutinin
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCS	multiple Klonierungsstelle
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MG	Methylglyoxal

min	Minuten
MW	Molekulargewicht
NF κ B	Nukleärer Faktor-kappaB
NHLF	normale humane Lungenfibroblasten
N-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAk	polyklonaler Antikörper
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium-Iodid
PBMC	periphere Blut-mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
RAGE	„receptor for advanced glycation endproducts“
ROI	„reactive oxygen intermediates“, reaktive Sauerstoffintermediate
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit PCR
SDS	Natriumlaurylsulfat
siRNA	„small interfering RNA“
SP-A/ D	Surfactantprotein A/ D
sRAGE	„soluble RAGE“, löslicher RAGE
TF	„tissue factor“, Gewebefaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TTR	Transthyretin
U	Einheiten
VCAM	„vascular cell adhesion molecule“
wt	Wildtyp

1 Einleitung

Seit Anfang des letzten Jahrhunderts nimmt die Lebenserwartung in den Industrieländern stetig zu. Dadurch erhalten Erkrankungen, die auf altersbedingte Veränderungen im Körper zurückzuführen sind, eine immer größere sozioökonomische Bedeutung. Eine besondere Rolle nimmt dabei Diabetes mellitus Typ II ein, die am häufigsten auftretende Stoffwechselstörung weltweit (Haller et al. 1996; Nathan et al. 1997). Sie ist gekennzeichnet durch Spätschäden an den Gefäßen, die vor allem auf die Hyperglykämie zurückzuführen sind (Zimmet and Alberti 1997). Eine mögliche Schlüsselrolle bei den diabetischen Gefäßschäden sowie bei weiteren chronischen Erkrankungen des Alterns kommt aufgrund zahlreicher Studien aus jüngster Zeit dem „Receptor for advanced glycation endproducts“ (RAGE) zu, der, wie sein Name sagt, Produkte der fortgeschrittenen Glykierung („advanced glycation endproducts“, AGE) bindet, die besonders im Alter und in erhöhtem Maß bei Diabetes auftreten.

1.1 Entstehung und Vorkommen von „advanced glycation endproducts“ (AGEs)

Bei der Verarbeitung und Lagerung von Lebensmitteln wurden thermisch induzierte Prozesse beobachtet, die die Qualität der Lebensmittel maßgeblich beeinflussen. Die dieser Beobachtung zugrunde liegenden Prozesse untersuchte L.C. Maillard erstmals 1912 unter definierten Bedingungen, nachdem aufgefallen war, dass Aminosäuren beim Erhitzen in der Gegenwart von reduzierenden Zuckern eine charakteristische gelb-braune Färbung und oftmals Fluoreszenz entwickeln (Maillard 1912). Bei der Maillard-Reaktion, auch als Glykierung bezeichneten Reaktion, reagieren reduzierende Kohlenhydrate wie Glukose nicht-enzymatisch mit Aminogruppen in Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren zu Schiff'schen Basen und in weiteren spontanen Umlagerungen zu Amadori-Verbindungen (1-Aminodesoxyketosen) (Singh et al. 2001; Schwenger et al. 2001; Brownlee et al. 1988; Ames et al. 1999). Während diese Reaktionen reversibel sind, führen weitere Modifikationen wie Dehydrierung und Kondensationsreaktionen zur Entstehung von irreversiblen quervernetzten Strukturen, die als „advanced glycation endproducts“ (AGE) bezeichnet werden (Abb. 1).

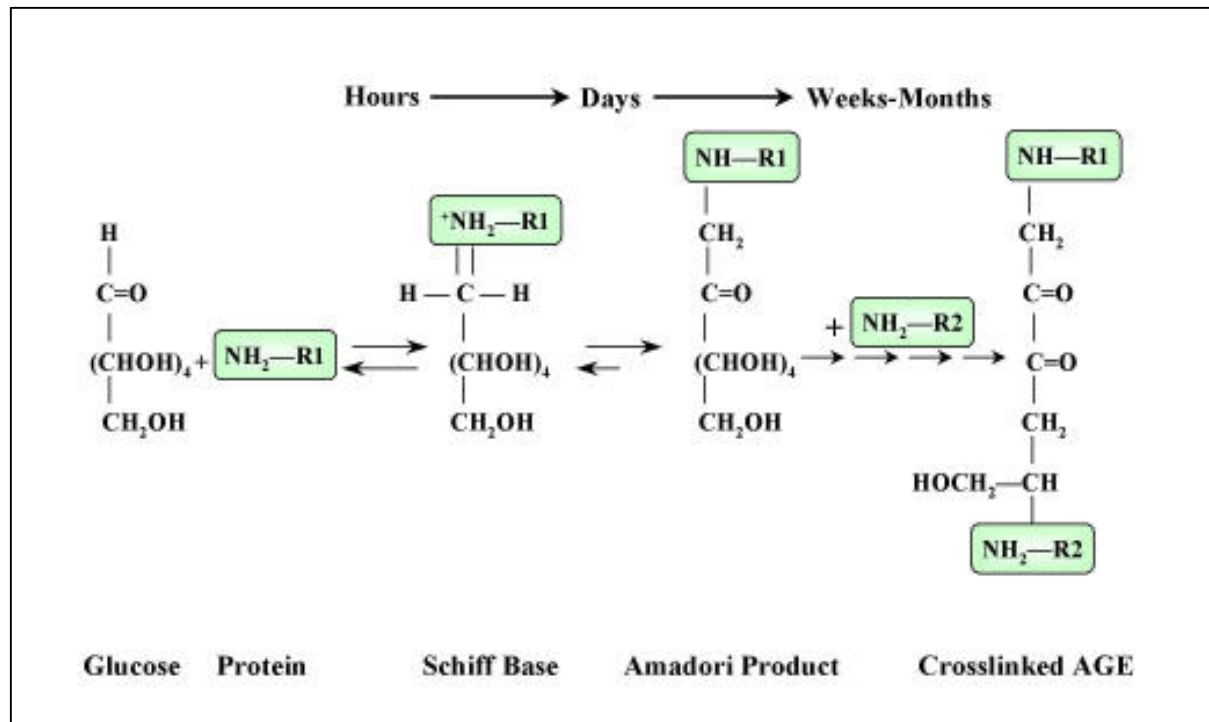


Abbildung 1. AGE-Bildung. Reduzierende Zucker (z.B. Glukose, Fruktose, Galaktose, Mannose, Ribose) reagieren schnell und in hohem Maße reversibel mit freien Aminogruppen, z.B. von Protein-Lysinresten zu Schiff'schen Basen. Die Bildung von Amadoriprodukten aus den Schiff'schen Basen dauert länger, ist aber schneller als die reversible Reaktion, so dass die Amadoriprodukte bevorzugt an Proteinen akkumulieren. An diesen Proteinablagerungen finden die irreversiblen fortgeschrittenen Glykierungsprozesse statt, die die heterogene Gruppe der AGEs hervorrufen. (Abbildung übernommen von (Aronson and Rayfield 2002)).

Die AGEs bilden eine komplexe und heterogene Gruppe, zu der unter anderem Strukturen wie Carboxymethyllysin (CML), Pyrralin, Imidazolinon, Pentosidin und Iminohydantoin zählen (Thornalley et al. 1999; Ahmed et al. 1986; Sell and Monnier 1989; Pongor et al. 1984). Lebensmittelchemiker untersuchen die Auswirkungen dieser Reaktion und ihrer Produkte auf Geschmack, Farbe und Texturveränderungen in gekochten, thermisch behandelten und gelagerten Lebensmitteln schon seit Beginn des 20. Jahrhunderts. Erst in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts entdeckte man, dass die Maillard-Reaktion auch *in vivo*, also im menschlichen Körper, während des Alterns (Monnier and Cerami 1981) und im erhöhten Maß bei Hyperglykämie, abläuft (Bunn et al. 1978). Die nicht-enzymatische Glykierung, die letztendlich zur Bildung der AGEs führt, findet aber auch an Orten von Entzündungsreaktionen, bei Nierenversagen und unter anderen Bedingungen, die mit systemischem oder lokalem oxidativem Stress in Zusammenhang stehen, statt (Brownlee 1995). Durch die bei Diabetes vorherrschende Hyperglykämie akkumulieren die entstehenden AGEs stetig (Schmidt et al. 1995b). Sie stehen in

Zusammenhang mit pathologischen Erscheinungen im Körper, die vor allem Folgeerkrankungen des Diabetes hervorrufen. Das humane Hämoglobin A1c (HbA1c) kann bei Diabetes vermehrt nachgewiesen werden, nachdem es posttranslational durch Amadori-Umlagerungen mit Glukose modifiziert wurde. Die Messung des AGE-modifizierten HbA1c dient mittlerweile standardmäßig als Marker der therapeutischen Einstellung des Blutzuckerspiegels in diabetischen Patienten (Rahbar et al. 1969; Koenig et al. 1976). Weitere Hauptangriffsziele für solche irreversiblen Modifikationen sind vor allem langlebige Proteine wie Kollagen oder das Kristallin der Linse (Brownlee et al. 1983; Monnier and Cerami 1983). Ein besonders folgenschweres Ereignis stellt die AGE-Bildung im Gefäßwand-Kollagen dar, da es zu Quervernetzung von Kollagen-Molekülen untereinander und mit zirkulierenden Proteinen führt (Sell et al. 1991; Brownlee et al. 1983). Dies ruft wiederum die Bildung von Gefäß-Plaques sowie eine Verdickung der Basalmembran hervor und vermindert die vaskuläre Elastizität (Sims et al. 1996), so dass die Gefäßfunktion schließlich dauerhaft beeinträchtigt wird. Solche Schädigungen betreffen sowohl große als auch kleine Gefäße mit unterschiedlichen Auswirkungen, und sie stellen eines der größten Probleme bei Erkrankungen wie Diabetes dar (Bierhaus et al. 1998). Neben den quervernetzenden AGEs, die sowohl die Proteinstruktur als auch deren Funktion beeinflussen, werden auch nicht-quervernetzende AGE Strukturen *in vivo* gefunden.

1.2 Der Rezeptor für „advanced glycation endproducts“ (RAGE)

1.2.1 Identifizierung von RAGE

Die Beobachtung, dass extrazelluläre, AGE-modifizierte Proteine zirkulieren und durch direkten Kontakt mit Gefäßendothelzellen pathologische Zell- oder Gewebeveränderungen hervorrufen können, veranlasste die Suche nach Zelloberflächen-Rezeptoren für solche AGE-modifizierten Proteine (Esposito et al. 1989; Thornalley 1998). Eine Vielzahl von Rezeptoren wurde beschrieben, zu denen der AGE-Rezeptor-Komplex (AGE-R1 – 3), der „Macrophage Scavenger Receptor“ (Typ I und II) und CD 36 zählen (Li et al. 1996; Vlassara et al. 1995; Araki et al. 1995; Suzuki et al. 1997; Ohgami et al. 2001). Die zentrale Rolle in der Biologie und Pathogenese der AGEs wird heute allerdings hauptsächlich einem weiteren Rezeptor mit der Bezeichnung „RAGE“ zugeschrieben. Schmidt et al. folgten Hinweisen, dass AGE-modifizierte Proteine spezifisch an kultivierte Endothelzellen binden (Bucala et

al. 1991) und unternahmen die Identifizierung und Charakterisierung von Endothelzell-Oberflächen-Bindungsproteinen, die den möglichen Rezeptor für AGE-modifizierte Strukturen beinhalten (Schmidt et al. 1992). Hierfür wurden Extrakte von boviner Lunge, die ein Endothelzell-reiches Gewebe darstellt, verschiedenen Chromatographie- und Gelfiltrationsverfahren unterzogen. Die dabei gereinigten Polypeptide wurden auf Plastikoberflächen immobilisiert, um in kompetitiven Studien ihre Bindungskapazität für AGE-modifiziertes BSA zu untersuchen. Neben bereits bekannten Molekülen wurde ein 35 Kilodalton (kD) großes Protein identifiziert, das durch neu generierte polyklonale Antikörper auf der Oberfläche von bovinen Endothelzellen nachgewiesen werden konnte. Die charakteristische Eigenschaft der AGE-Bindung führte zu der Bezeichnung „receptor for advanced glycation endproducts“ (RAGE). In folgenden Studien wurde die Gesamtlängen-cDNA von 1,5 Kilobasen (kb) aus einer bovinen und später humanen Lungen cDNA Bibliothek isoliert. Dabei wurde eine 90 %-ige Homologie zwischen den Sequenzen beider Spezies festgestellt (Neeper et al. 1992).

1.2.2 Aufbau von RAGE

Die bovine cDNA kodiert für 394 Aminosäuren des maturen Proteins. Dieses Protein besteht aus einer Signalsequenz von 22 Aminosäuren, einer extrazellulären Domäne bestehend aus 332 Aminosäuren, einer Transmembran-Domäne von 19 hydrophoben Aminosäuren sowie einer kurzen intrazellulären Domäne aus 43 stark geladenen Aminosäuren. Das Gen des humanen *RAGE* wurde auf dem Chromosom 6p 21.3, in der HLA Klasse III Region lokalisiert (Vissing et al. 1994). Sequenzanalysen lieferten Hinweise, dass RAGE ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie darstellt (Sugaya et al. 1994). Übereinstimmend hiermit konnte in weiteren Analysen gezeigt werden, dass dieser Rezeptor drei mögliche Immunglobulin-Domänen besitzt, die sich im extrazellulären Teil des Proteins befinden. Die erste Domäne ist am N-Terminus des Proteins lokalisiert und weist Charakteristika einer variablen Domäne (V-Domäne) auf. In Bindungsstudien mit verschiedenen Deletionskonstrukten wurde sie als AGE-Bindungs-Domäne identifiziert (Neeper et al. 1992; Kislinger et al. 1999). Dieser Abschnitt der Sequenz beinhaltet zwei mögliche N-Glykosylierungsstellen, die darauf hinweisen, dass RAGE posttranslational modifiziert wird (Srikrishna et al. 2002). Die beiden folgenden Domänen ähneln konstanten Domänen von Immunglobulinen (C- und C'-Domäne).

Obwohl die C-Domänen vermutlich nicht direkt an der Ligandenbindung beteiligt sind, könnten sie eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der V-Domäne ausüben und so deren Ligandenbindung unterstützen. RAGE wurde anfänglich die Funktion zugesprochen, AGEs zu internalisieren, was ihn als „Scavenger-Rezeptor“ auszeichnete (Schmidt et al. 1994b; Gugliucci and Bendayan 1995). Weitere Studien wiesen hingegen darauf hin, dass RAGE eher als Signal-Rezeptor fungiert, der über den zytoplasmatischen Anteil zelluläre Veränderungen und Aktivierung nach Liganden-Bindung bewirkt (Schmidt et al. 2001) und nicht die beschleunigte Beseitigung oder den Abbau von Liganden. Bei der Deletion des geladenen, intrazellulären Anteils des Rezeptors werden Liganden zwar noch über die V-Domäne gebunden, eine Zellaktivierung erfolgt jedoch nicht mehr. Diese Form wird als dominant-negative Mutante (DN-RAGE) bezeichnet, da sie selbst bei Vorhandensein von Wildtyp-RAGE in der gleichen Zelle die Signalweiterleitung blockiert (Hofmann et al. 1999). Die molekularen Mechanismen der Signalprozesse sind dabei allerdings noch nicht bekannt, da keine typischen Signalmotive, wie Phosphorylierungsstellen oder Kinase-Domänen gefunden werden konnten. Sowohl diese Mutante, der der C-terminale Bereich des Rezeptors, sowie eine weitere Mutante, der die gesamte intrazytoplasmatische Sequenz samt der Transmembrandomäne (soluble oder sRAGE; löslicher RAGE) fehlt, treten auch *in vivo* auf. Sie sind auf Splice-Varianten des *RAGE*-Gens zurückzuführen, die in unterschiedlichen Zellen exprimiert werden (Yonekura et al. 2003; Malherbe et al. 1999) (Abb. 2)

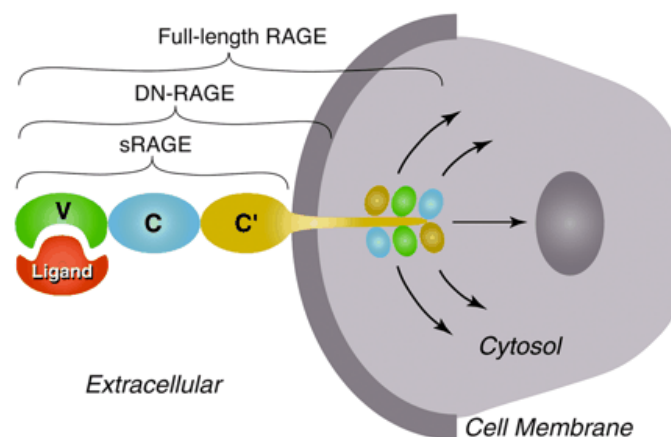


Abbildung 2. Schematische Darstellung des RAGE-Proteins mit charakteristischen Domänen. Gesamtlängen-RAGE („full length“ oder flRAGE) besteht aus der vollständigen Sequenz. Löslicher RAGE („soluble“ oder sRAGE) beinhaltet nur die extrazelluläre Domäne. Die V-Domäne ist verantwortlich für die Bindung der RAGE-Liganden. Die Deletion des zytoplasmatischen Anteils führt zu einer modifizierten Form von RAGE („dominant-negativer“, DN-RAGE), die noch Liganden bindet und

noch fest in der Membran verankert bleibt, aber keine RAGE-vermittelte zelluläre Aktivierung hervorrufen kann. Abbildung übernommen von Schmidt et al. (2001)

1.2.3 Lokalisation von RAGE

Da AGE-modifizierte Proteine an die Oberfläche von Endothelzellen banden (Esposito et al. 1989), wurde für die Reinigung und biochemische Charakterisierung des AGE-Rezeptors das besonders endothelreiche, bovine Lungengewebe verwandt. Nach der Identifizierung des humanen *RAGE*-Gens wurde der Rezeptor rekombinant hergestellt. Gegen das gereinigte bovine RAGE sowie gegen rekombinant hergestelltes humanes RAGE wurden monospezifische, polyklonale Antikörper hergestellt, mit denen mittels Immunfärbungen RAGE hauptsächlich in Gefäßen, vor allem auf Endothelzellen, aber auch auf glatten Gefäßmuskelzellen, in Herzmuskelzellen, sowie in mononukleären Blutzellen, und überdies in neuronalem Gewebe nachgewiesen werden konnte (Brett et al. 1993; Ritthaler et al. 1995). Im Gegensatz zu der Verteilung des RAGE-Antigens wurden hohe Transkriptmengen der *RAGE* mRNA mittels *in situ* Hybridisierung in gesunden Geweben überwiegend in Lungengewebe detektiert, im Vergleich zu niedrigeren Niveaus in Herz, Gehirn, Leber, Skelettmuskulatur und Niere (Brett et al. 1993). Neben der Expression in normalem Gewebe konnten in dieser Studie auch RAGE-exprimierende Zellen in atherosklerotischen Plaques demonstriert werden.

Mit der Identifizierung des Rezeptors, der Untersuchung seines Aufbaus und der Funktion mittels biochemischer Charakterisierung und cDNA-Klonierung und der Lokalisation in verschiedenen Geweben, entdeckte man weitere Liganden. Diese rufen als Folge der Interaktion mit RAGE unterschiedlichste Effekte in den diversen Zelltypen hervor (Schmidt et al. 2000; 2001).

1.3 Die Liganden von RAGE

Zu den Liganden des als „Multi-Liganden-Rezeptor“ bezeichneten RAGE zählen AGEs (Kislinger et al. 1999), β -Amyloid-Strukturen (Yan et al. 1996), die S100/Calgranulin Familie von proinflammatorischen Zytokin-ähnlichen Mediatoren (Hofmann et al. 1999) und das „high mobility group 1 box“ (HMGB-1) DNA-bindende Protein Amphoterin (Taguchi et al. 2000; Hori et al. 1995). Kürzlich wurde RAGE zusätzlich als Gegenrezeptor für das Leukozyten-Integrin Mac-1 identifiziert, wodurch RAGE direkt die Fähigkeit zu der Rekrutierung von inflammatorischen Zellen zugesprochen wurde (Chavakis et al. 2003). Bemerkenswert ist, dass die Expression

des Rezeptors durch die Anwesenheit oder Akkumulation dieser Liganden bestimmt wird (Tanaka et al. 2000). Somit findet man in gesunden, adulten Tieren in den meisten Geweben nur eine niedrige RAGE-Expression; häufen sich die Liganden allerdings an, wird damit auch die verstärkte Expression des Rezeptors ausgelöst (Yan et al. 1996; Ritthaler et al. 1995; Brett et al. 1993; Park et al. 1998). Diese Eigenschaft unterscheidet RAGE von vielen anderen Multi-Liganden-Rezeptoren, wie zum Beispiel dem „Low Density Lipoprotein“ (LDL) Rezeptor, dessen Expression in einer Lipoprotein-reichen Umgebung unterdrückt wird (Herz and Willnow 1995). Bei RAGE dagegen beobachtet man eine positive Rückkoppelung: binden Liganden an RAGE wird intrazytoplasmatisch eine Signalkaskade ausgelöst. Diese Kaskade führt zur Transkriptions-Aktivierung des *RAGE*-Gens, wobei man annimmt, dass die in der Promotorregion identifizierten NF κ B- („nuclear factor kappaB“) Bindungsstellen involviert sind (Li and Schmidt 1997). Durch die resultierende erhöhte Rezeptordichte an der Zelloberfläche können wiederum weitere Liganden an RAGE binden. Die unkontrollierte Amplifikation der Signale kann letztendlich zelluläre Dysfunktion hervorrufen (Soulis et al. 1997). Ein Hauptmechanismus bei den mit RAGE in Zusammenhang gebrachten Erkrankungen scheint die ungewöhnlich lang anhaltende Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B zu sein. NF κ B untersteht unter normalen Bedingungen einer strengen negativen Regulierung durch das inhibitorisch wirkende Molekül I κ B und löst schnelle, genau dosierte Mechanismen bei der Immunabwehr aus und fördert anti-apoptotische Programme (May and Ghosh 1997; Baeuerle and Henkel 1994; Beg and Baltimore 1996). Im Gegensatz dazu werden durch die RAGE-Liganden-Interaktion Mechanismen ausgelöst, die die I κ B-abhängige Selbstregulation überlagern und so zu einer lang anhaltenden Aktivierung von NF κ B führen (Bierhaus et al. 2001). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht bekannt, die ultimative Folge sind jedoch ausgeprägte Störungen der Zellfunktion, und schließlich das Auslösen des programmierten Zelltods, weshalb die Expression von RAGE hauptsächlich in Zusammenhang mit diversen pathologischen Erscheinungen gebracht wurde.

1.3.1 RAGE-AGE-Interaktion

AGEs mit ihren heterogenen Modifizierungen entstehen in Situationen wie lang anhaltender Erhöhung des Glukosespiegels im Plasma, aber auch bei Sauerstoffradikalbildung, Entzündung, neurodegenerativen Erkrankungen wie

Alzheimer und bei Nierenversagen (Brownlee 1995; Sousa et al. 2001; Makita et al. 1995; Smith et al. 1994).

Wenn AGEs an RAGE binden, werden zelluläre Eigenschaften, die für die Gefäßhomöostase bedeutend sind, verändert (Bierhaus et al. 1997; Yamagishi et al. 1998; Yamagishi et al. 1997). Je nach involviertem Zelltyp werden unterschiedliche proinflammatorische Effekte ausgelöst. So führt die durch RAGE hervorgerufene Aktivierung von Endothelzellen zu einer Induktion pathogenetisch relevanter Faktoren. Dazu zählen die veränderte Expression des Gerinnungsfaktors „procoagulant tissue factor“ (TF) (Esposito et al. 1989; Bierhaus et al. 1995), und des Adhäsionsmoleküls „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1) (Schmidt et al. 1995a). Die Interaktion von AGEs mit RAGE verursacht weiterhin eine Störung der Barrierefunktion des Endothels mit erhöhter Gefäßpermeabilität (Wautier et al. 1996), was ein typisches Phänomen der diabetischen Mikrovasculopathie darstellt (Williamson et al. 1987). In Makrophagen hingegen stimulieren lösliche, zirkulierende AGEs Chemotaxis, während immobilisierte AGEs, z.B. an der extrazellulären Matrix, Haptotaxis auslösen, wodurch die Migration von RAGE-exprimierenden Zellen gestoppt werden kann (Schmidt et al. 1993). Eine besondere Bedeutung kommt der Interaktion von RAGE-exprimierenden Phagozyten mit AGE-modifiziertem β_2 Mikroglobulin (β_2 M) in der Pathogenese der Dialyse-abhängigen Amyloidose zu (Miyata et al. 1996), in deren Verlauf Entzündungsreaktionen in den Amyloidablagerungen von Langzeit-Hämodialysepatienten ausgelöst werden. Auch glatte Gefäßmuskelzellen werden durch AGEs zu erhöhter Zellmigration und zur Produktion von Wachstums- und Chemotaxisfaktoren angeregt.

Neben der erhöhten Gefäßpermeabilität stellt die akzelerierte Atherosklerose eines der Hauptprobleme des Diabetes dar. Sie verschlechtert das Krankheitsbild maßgeblich und führt zu erhöhter Mortalität (Hudson et al. 2003; King et al. 1998; Park et al. 1998). *In vivo* Untersuchungen in etablierten Mausmodellen führten diese Komplikationen ebenfalls auf die Akkumulation von AGEs und deren Bindung an RAGE-exprimierende Zellen, wie Endothelzellen, glatte Muskelzellen und infiltrierende Makrophagen, zurück (Yamamoto et al. 2000; 2001). Des Weiteren wurde RAGE in Untersuchungen weiterer Mausmodelle für diabetische Nephropathie und für verlangsamte Wundheilung verantwortlich gemacht (Sakurai et al. 2003; Wendt et al. 2003; Goova et al. 2001).

Die Rolle der endogen gebildeten AGEs in diversen pathologischen Situationen, wie sie hier beschrieben wurden, ist wesentlich ausführlicher charakterisiert als mögliche Konsequenzen der Aufnahme von exogen gebildeten AGEs, die bei der Herstellung von Lebensmitteln entstehen (Singh et al. 2001; Faist et al. 2001). Es gibt jedoch Studien, die die Aktivierung der immortalisierten Dickdarmzelllinie Caco-2 nach der Stimulation mit Lebensmittelextrakten untersuchten. Durch die Beobachtung der Aktivierung von Signaltransduktions-Kaskaden in dem Zellkultur-System folgerten die Autoren, dass die in Nahrungsmitteln vorhandenen AGEs gesundheitsschädlich wirken könnten (Zill et al. 2001; 2003). In diabetischen Patienten wurde beobachtet, dass bei einer verminderten Nierenfunktion von Nahrungsmitteln abstammende AGEs im Serum akkumulieren können (Koschinsky et al. 1997), was bedeutet, dass eine normale Nierenfunktion wichtig für den Schutz vor Lebensmittel-AGEs ist. Im Gegensatz dazu belegten Studien mit Ratten, dass alimentär zugeführtes CML ohne erkennbare Zellschädigungen über die Nieren ausgeschieden wurde (Wenzel et al. 2002).

Alle Studien, die die AGE-RAGE Interaktion beschreiben, liefern die Kernaussage, dass die Bindung von AGEs an RAGE zu Zellaktivierung führt, die letztendlich auf eine vermehrte und vor allem lang andauernde Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B in den Kern zurückzuführen ist (Bierhaus et al. 2001). RAGE wird die Schlüsselrolle dabei indirekt zugesprochen, da die Effekte in den jeweiligen Studien durch die Zugabe von löslichem RAGE (sRAGE) oder anti-RAGE-Reagenzien unterdrückt werden konnten (Park et al. 1998; Schmidt et al. 1994a), ohne dass dabei jedoch die Anwesenheit des Rezeptors im Gewebe direkt nachgewiesen wurde.

1.3.2 RAGE-Amyloid-Interaktion

Ähnlich wie AGEs führen auch Amyloid-Ablagerungen zu chronisch-entzündlichen Prozessen in Endothelzellen. Interessanterweise führte die Suche nach Mechanismen, die den sogenannten Amyloidosen zugrunde liegen, unter Anderem zu RAGE (Yan et al. 1996). Die Bindung von Amyloid-Fibrillen an RAGE spiegelt dessen generelle Affinität für quervernetzte β -Faltblatt-Stränge wider, da sowohl Fibrillen von Amylin, wie auch von unterschiedlich langen Amyloid β - (A β) -Peptiden (A β 1-40 und A β 1-42), und von Prionen stammende Peptide von RAGE gebunden werden (Yan et al. 2000). Amylin besteht aus einer Peptid-Untereinheit des Amyloids.

Es tritt in den Inselzellen des Pankreas auf. Bei der Induktion des Diabetes mellitus lagert es sich zu Fibrillen zusammen. Ablagerungen von β -Amyloid-Fibrillen sind in erhöhtem Maß im Gehirn von Alzheimer Patienten zu finden, wo sie durch die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen intermediates“, ROIs) direkt neurotoxisch wirken (Hensley et al. 1994; Selkoe 2001; Yan et al. 1996). Parallel dazu wird RAGE bei dieser Erkrankung vermehrt in Neuronen und Mikrogliazellen exprimiert, wodurch A β Rezeptor-vermittelt zytotoxisch wirken kann. Ähnlich wie es für die AGEs beschrieben wurde, variieren die Effekte der A β -Bindung an RAGE je nach beteiligtem Zelltyp. Während die A β -RAGE-Interaktion eine anhaltende Aktivierung der Mikrogliazellen hervorruft, die sich durch erhöhte Motilität, NF κ B-Aktivierung, Zytokin-Produktion, vor allem dem „macrophage-colony stimulating factor“ (M-CSF), und Proliferation auszeichnet (Yan et al. 1996), führt die anfängliche RAGE-abhängige neuronale Aktivierung, die sich zunächst ebenfalls durch M-CSF Produktion äußert, letztendlich zu Caspase-3 vermittelter Apoptose der Neuronen (Sousa et al. 2001). Das durch die RAGE-A β -Interaktion produzierte M-CSF wirkt autokrin oder parakrin nur auf die Mikrogliazellen, da diese im Gegensatz zu den Neuronen, den Rezeptor c-fms exprimieren. Dadurch wird das Überleben der Mikrogliazellen in Anwesenheit sonst toxischer Konzentrationen von A β gefördert, während Neuronen in dieser Umgebung absterben. Diese erhöhte Mikroglia-Proliferation stellt einen bekannten Befund der Alzheimer Erkrankung dar. Bei der Familiären Amyloid Polyneuropathie (FAP) handelt es sich um eine weitere neurodegenerative Krankheit, die durch die extrazelluläre Ablagerung von Amyloid-Fibrillen charakterisiert ist, die in diesem Fall aus mutierten Formen des Transthyretins (TTR) bestehen (Coimbra and Andrade 1971). In FAP-betroffenen Geweben konnte ebenso eine erhöhte RAGE-Expression festgestellt werden, die auf die Interaktion mit TTR-Amyloid-Fibrillen und folgende Hochregulation des Rezeptors zurückgeführt wurde (Sousa et al. 2001). Im Verlauf der Krankheit treten RAGE-induzierte zelluläre Störungen auf, die, ähnlich wie bei der Alzheimer Krankheit, durch lang anhaltende Zellaktivierung mit einhergehender NF κ B-Translokation und schließlich Induktion von Zytokinen und der induzierbaren Stickoxid-Synthetase (iNOS) hervorgerufen werden.

In den beschriebenen Studien konnten die RAGE-vermittelten Effekte durch anti-RAGE-Immunglobuline oder durch Zugabe von überschüssigem sRAGE blockiert

werden, wodurch auch hier indirekt eine Schlüsselrolle von RAGE in Amyloidosen postuliert wurde (Yan et al. 2000).

Sowohl die Interaktion mit AGEs als auch mit Amyloid-Fibrillen deuten darauf hin, dass RAGE ein Schlüsselmolekül für chronische Erkrankungen und altersbedingte Gesundheitsstörungen darstellt.

1.3.3 RAGE-S100-Interaktion

Nachdem weder AGEs noch Amyloid-Fibrillen unter physiologischen Bedingungen auftreten, wurde vermutet, dass diese Strukturen „zufällige“ Liganden darstellen, und die Interaktion mit RAGE ein sekundärer Effekt ist. Daher suchte man nach „natürlichen“ Liganden für diesen Rezeptor, die in gesundem Gewebe vorkommen. Es lag nahe, diese Suche in der Lunge durchzuführen, da hier auf Gefäßendothelzellen die höchste physiologische Expression von RAGE nachgewiesen wurde (Brett et al. 1993). Die extrazelluläre Domäne von RAGE, die die variable Domäne und somit wahrscheinlichste Bindungskapazität beinhaltet, wurde zu diesem Zweck an Affinitätssäulen immobilisiert, und Proteinextrakte aus Lungengewebe wurden auf ihre Fähigkeit, an das immobilisierte Rezeptormolekül zu binden, untersucht. Auf diese Weise konnten zwei Polypeptide mit Molekulargewichten von 12 kD, bzw. 23 kD isoliert werden (Hori et al. 1995). Das erste stellte sich als Mitglied der Amphoterin-Familie heraus (siehe später), und das zweite, 12 kD große konnte als Mitglied der S100/ Calgranulin Familie identifiziert werden. Die Bindung an RAGE verlieh ihm den Namen EN-RAGE für „extracellular newly identified RAGE-binding protein“, das auch als S100A12 bekannt ist (Miranda et al. 2001). RAGE bindet weitere Mitglieder dieser Familie, darunter wurde S100B intensiv als RAGE-Ligand untersucht (Hofmann et al. 1999). Das führte zu der Annahme, dass die Interaktion von RAGE mit weiteren Mitgliedern dieser Multi-Gen-Familie durch eine gemeinsame Strukturdeterminante in den Liganden vermittelt werden könnte. Die S100/ Calgranulin Mitglieder sind Kalzium-bindende Proteine, die durch zwei EF-Hand Motive und häufig Dimersierung charakterisiert sind (Donato 2001; Schafer and Heizmann 1996). Die meisten S100 Proteine kommen intrazellulär vor, wo sie auch ihre diversen, für jedes Mitglied spezifischen Funktionen ausüben, wie z.B. eine Beteiligung an der Regulierung von Zellwachstum und Beweglichkeit, an der Regulation des Zellzyklus, an der Transkription sowie an der Differenzierung. Vor allem bei Auftreten chronischer Immunantworten bzw. Entzündungsreaktionen

werden einige S100 Proteine aus der Zelle sezerniert. So können sie extrazellulär Zytokin-ähnlich wirken und teilweise Rezeptor-vermittelt parakrine Effekte auf RAGE-exprimierende Endothelzellen, mononukleäre Phagozyten, sowie Lymphozyten ausüben. Unter Anderem konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von EN-RAGE zu Lymphozyten proinflammatorische Reaktionen, wie IL-2 (Interleukin) Produktion und Zellproliferation, ausgelöst wurden. In Phagozyten dagegen führten die gleichen Bedingungen zur Bildung von IL-1 β und TNF- α (Tumornekrosefaktor) und in Endothelzellen wurde VCAM-1 hochreguliert (Hofmann et al. 1999). Diese Beobachtungen führten zu vollkommen neuen biologischen Aspekten hinsichtlich der Eigenschaft von RAGE als akutem Entzündungsmediator. In einem Mausmodell der Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ konnte der Effekt der RAGE-S100-Interaktion auf die Zellaktivierung *in vivo* untersucht werden (Hofmann et al. 1999). Zusätzlich wurde von Hofmann *et al.* die Beteiligung von RAGE und EN-RAGE an chronischen Entzündungsreaktionen am Beispiel der Colitis ulcerosa demonstriert. Gänzlich andere Funktionen werden einem weiteren S100 Protein, S100B, zugeschrieben. Es kommt hoch exprimiert im Nervensystem vor und ist ebenfalls extrazellulär vorzufinden, wo man ihm Zytokin-Funktionen zuschreibt (Griffin et al. 1998). Zusammen mit der Amphoterin-Bindung an RAGE (siehe später) löst es in neuronalen Zellen die „extracellular regulated kinase“ (ERK)-Signalkaskade und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B aus, wodurch es Neuritenwachstum induziert und Zellüberleben fördert (Huttunen et al. 2000). Dieser physiologische Effekt der RAGE-S100-Interaktion wird nur durch nanomolare Konzentrationen von S100B ausgelöst, wohingegen mikromolare Konzentrationen neurotoxisch wirken und in Oxidations-abhängiger Weise Apoptose auslösen. Die Aktivierung von RAGE kann also trophische Effekte bewirken. Eine Hyperaktivierung der RAGE-vermittelten Signalwege wandelt diese jedoch in zellschädigende Effekte um, die bis zum Zelltod führen können. Wie RAGE sowohl trophische als auch toxische Zellantworten durch denselben Liganden hervorrufen kann, ist noch nicht bekannt. Die Blockierung von RAGE konnte Entzündungsreaktionen sowohl in akuten als auch chronischen Modellen unterdrücken. Dabei führte die Inhibierung der RAGE-S100-Interaktion zu einer verringerten NF κ B-Aktivierung und niedrigerer Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Gewebe. Auch wenn RAGE-unabhängige Mechanismen nicht ganz ausgeschlossen werden konnten, wurde dieser Rezeptor aufgrund der von anti-RAGE-Antikörpern und sRAGE ausgelösten hemmenden

Effekte als sehr wahrscheinlicher Mediator der beschriebenen Entzündungsantworten angenommen (Hofmann et al. 1999).

1.3.4 RAGE-Amphoterin-Interaktion

Das zweite, 23 Kilodalton (kD) große Protein, das bei der Suche nach weiteren Bindungspartnern für RAGE isoliert wurde, zeigte in seiner Sequenz Übereinstimmung mit dem schon bekannten Protein Amphoterin (Hori et al. 1995). Amphoterin oder auch „high mobility group 1 B“ (HMGB1) Protein genannt (Merenmies et al. 1991), kommt im Zellkern vor und bindet dort an Chromatin. Es wird aber auch extrazellulär, vor allem während der Embryonalentwicklung, gefunden, wo es Zellwachstum und Migration fördert (Bianchi et al. 1989). Da Amphoterin eine klassische Signalsequenz fehlt, ist der Exportmechanismus bis jetzt kaum verstanden. Der klassische ER (Endoplasmatisches Retikulum)/ Golgi-Weg wird jedoch ausgeschlossen, und man nimmt an, dass Amphoterin über endolysosomale Vesikel sezerniert wird (Gardella et al. 2002; Passalacqua et al. 1997). In weiteren Studien konnte gereinigtes Amphoterin als spezifischer Ligand für RAGE nachgewiesen werden. Es bindet dosisabhängig sowohl an immobilisiertes sRAGE als auch an RAGE-exprimierende Zellen, wobei die Bindung von Amphoterin an RAGE höher affin ist als die der AGEs (Hori et al. 1995). Amphoterin wurde sehr hoch exprimiert in embryonalen Neuronen von Ratten nachgewiesen, wo ihm adhäsive Funktionen zugesprochen wurden (Rauvala and Pihlaskari 1987). In früheren Studien, die die Gewebeverteilung von RAGE untersuchten, konnte RAGE in verschiedenen Zellen des adulten Nervensystems nachgewiesen werden (Brett et al. 1993). Nach der Identifizierung von Amphoterin als hoch affinen Liganden für RAGE konnte gezeigt werden, dass die gleichen Zellen während der Gehirnentwicklung sowohl sekretorisches Amphoterin als auch RAGE exprimierten. Die Fähigkeit von Amphoterin, Neuritenwachstum auszulösen, konnte in *in vitro* Untersuchungen mit kortikalen Ratten-Neuronen auf die Bindung an RAGE zurückgeführt werden, da durch Zugabe von sRAGE oder anti-RAGE-Antikörpern, aber auch der Expression von DN-RAGE in diesen Zellen das Neuritenwachstum unterdrückt werden konnte (Huttunen et al. 1999; Hori et al. 1995). Somit scheint RAGE, im Gegensatz zu den pathologischen Wirkungen in adulten Tieren, eine physiologische Funktion während der Embryonalentwicklung auszuüben. Wie es schon für die anderen Liganden beschrieben wurde, konnte auch für Amphoterin ein

Einfluß auf die Erhöhung der RAGE-Expression nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu der im pathologischen Umfeld auftretenden NF κ B-vermittelten Transkriptionsaktivierung, wurden in der Anwesenheit von Amphoterin Bindungselemente für SP-1, ein entscheidender Transkriptionsfaktor in der frühen Embryonalentwicklung, im Promotor des *RAGE*-Gens genutzt (Li et al. 1998; Marin et al. 1997).

Auch in Tumorgewebe und transformierten Zellen wurde Amphoterin identifiziert (Kawahara et al. 1996; Xiang et al. 1997; Parkkinen et al. 1993). Der Befund, dass RAGE in Zusammenhang mit Amphoterin an der Bildung der Neuritenfortsätze beteiligt ist, deutete auf eine mögliche Rolle beim Wachstum und bei den invasiven Eigenschaften von Tumoren hin. Einige Tumorgewebe zeigten eine erhöhte Expression von RAGE (Taguchi et al. 2000), so dass in neoplastischem Gewebe die Konzentration RAGE-exprimierender Zellen und gleichzeitig des Liganden Amphoterin in erhöhtem Maß nachgewiesen wurden. Welche Auswirkungen dieser Befund auf das Tumorverhalten hat, wurde in zwei verschiedenen Mausmodellen untersucht. Die Blockade von RAGE durch Applikation von sRAGE führte in beiden Modellen zu verringertem Tumorwachstum, sowie geringerer Metastasierung in einem der Modelle (Taguchi et al. 2000).

Amphoterin wird zusätzlich zu der Expression im Nervensystem und in Tumoren von aktivierten Monozyten und Makrophagen freigesetzt (Rouhiainen et al. 2004). Im Serum von Patienten mit endotoxischem oder haemorrhagischem Schock wurden aus diesem Grund hohe Konzentrationen von Amphoterin gemessen (Ombrellino et al. 1999; Rendon-Mitchell et al. 2003; Wang et al. 2004; Abraham et al. 2000). Sezerniertes Amphoterin wirkt sowohl autokrin als auch parakrin und vermittelt die Migration und den Gefäßdurchtritt von Monozyten in einer RAGE-abhängigen Weise. Die Interaktion von Amphoterin mit membranständigem RAGE führt also je nach Umgebung, in der diese beiden Moleküle aufeinander treffen, zu unterschiedlichen Auswirkungen, die vom Neuritenwachstum bis zu der zuletzt beschriebenen Beteiligung an Entzündungsreaktionen reichen. Amphoterin, als Lektin (Srikrishna et al. 2001), bindet dabei an die N-verknüpften Zuckerstrukturen, die in der variablen Domäne von RAGE vorhanden sind (Parkkinen et al. 1993; Srikrishna et al. 2002). Somit scheinen alle beschriebenen Liganden mit der V-Domäne von RAGE zu interagieren und in der Folge zu vielfältigen, vor allem pathologischen Erscheinungen zu führen, die in der Tabelle 1 zusammengefasst sind.

“Advanced glycation endproducts”	Diabetes, Nierenversagen; Amyloidosen; Entzündung; Radikalbildung; Altern	Brownlee et al. , Annu. Rev 1995; Schmidt et al. , Nat.Med. 1995; Kislinger et al. , J.Biol.Chem 1999; Sakurai et al. , J. Am. Soc. Nephrol. 2003; Myiata et al. J.Clin.Invest. 1996
β-Amyloid; β-Faltblatt-Fibrillen	M. Alzheimer, Amyloidosen	Yan et al. , Nature 1996; Yan et al. , Nat.Med. 2000 Sousa et al. , J.Neuosci. 2001
S100/ Calgranulin	Entwicklung; Neuritenwachstum; Entzündung	Hofmann et al. , Cell 1999; Huttunen et al. , J.Biol.Chem. 2000
Amphoterin	Entwicklung; Neuritenwachstum; Entzündung; Tumorwachstum und Metastasierung	Hori et al. , J.Biol.Chem. 1995; Huttunen et al. , J.Biol.Chem. 1999; Taguchi et al. , Nature 2000

Tabelle 1: RAGE Liganden und deren Beteiligung an pathologischen und physiologischen Mechanismen. Angabe ausgewählter Referenzen.

1.4 Aufbau der Lunge

Eine besonders starke Expression von RAGE wurde in der Lunge beschrieben (siehe S. 12). Obwohl dies eine physiologische Funktion von RAGE in diesem Organ nahe legt, wurden hierzu keine weiteren Untersuchungen unternommen. Um die in dieser Arbeit analysierte exakte Lokalisation und Funktion von RAGE in der Lunge besser verstehen zu können, wird zunächst der Aufbau der Lunge erläutert.

Die Lunge ist aufgeteilt in den luftleitenden Teil und den eigentlichen respiratorischen Trakt, wobei mehr als 40 verschiedene Zelltypen im Lungenaufbau involviert sind (Weibel 1988). Das respiratorische Gewebe besteht aus den respiratorischen Bronchiolen, den Alveolargängen und den Alveolen. Über die mehr als 300 Millionen vorhandenen Alveolen findet der Gasaustausch mittels Diffusion statt. Sie haben einen Durchmesser von ungefähr 250 µm und umfassen insgesamt eine Fläche von 70 m². Die Alveolaroberfläche ist beidseitig von Alveolarepithel bedeckt, das aus zwei spezialisierten Zelltypen, den Alveolarepithelzellen Typ I und Typ II (AT I Zellen, bzw. AT II Zellen), besteht, die wiederum von einem feinen Kapillarnetz umspannt sind (Abb. 3A). Die Blut-Luft-Schranke wird durch das Zytoplasma und die apikale und basolaterale Membran der AT I Zellen, sowie durch die verschmolzene Basalmembran und das Zytoplasma und die Membran der Endothelzellen der Kapillaren gebildet (Abb. 3B).

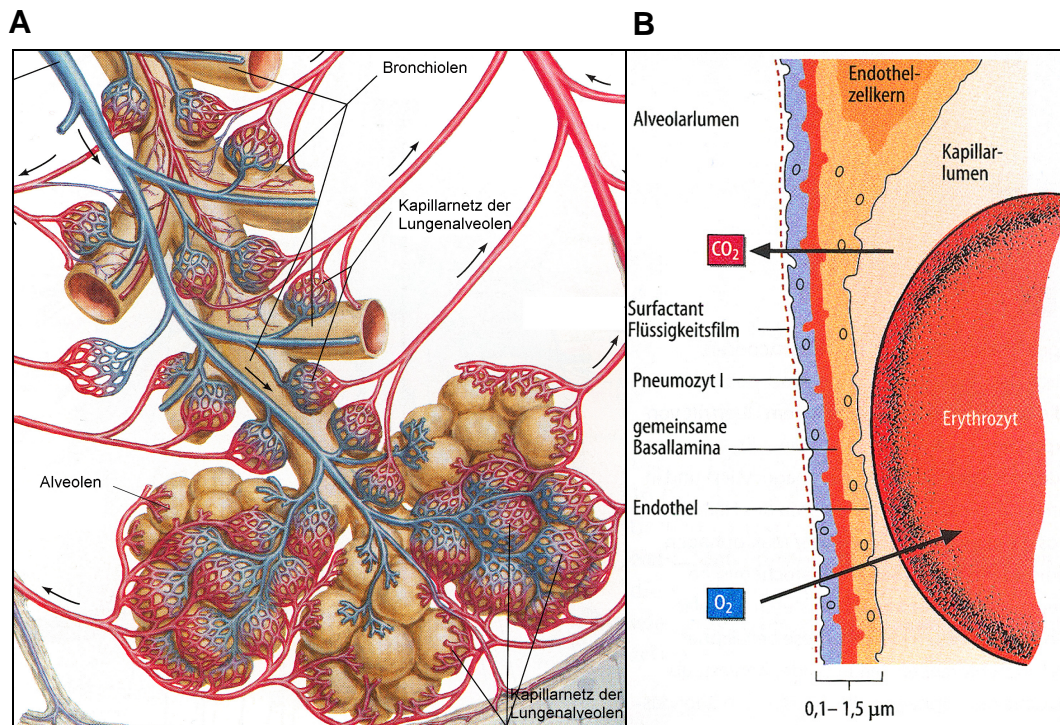


Abbildung 3. Respiratorischer Trakt der Lunge. (A) Die Bronchiolen verzweigen sich in die Alveolargänge und enden schließlich in den Alveolen, die von einem engem Kapillarnetz umgeben sind. An dieser Stelle findet der Gasaustausch mittels Diffusion statt (modifiziert nach Netter NH: Atlas der Anatomie des Menschen, 2. Auflage, 1999, Novartis Pharma AG; Thieme Verlag). (B) Schematische Darstellung der Blut-Luft-Schranke: zwischen der basalen Membran der langgestreckten AT I Zelle (Pneumozyt I) und der Kapillarendothelzelle liegt eine gemeinsame Basallamina, so dass eine schmale Barriere von 0,1 – 1,5 µm für den effektiven Gasaustausch gewährleistet wird. Die apikale Membran der AT I Zellen ist mit einem Surfactantfilm überzogen, der die Oberflächenspannung verringert und somit verhindert, dass die Alveolen während der Ausatmung zusammenfallen (modifiziert nach Junqueira LC et al., Basic Histology, 9. Auflage, 1998, Appleton Lange).

Um einen effizienten Gasaustausch zu gewährleisten, beträgt die Blut-Luft-Schranke lediglich 0,1 – 1,5 µm. Dies beruht auf dem außerordentlich dünnen, gestreckten Zytoplasma der AT I Zellen. Mit ihren langen Fortsätzen bedecken sie ungefähr 95 % der Alveolaroberfläche, obwohl sie nur 40 % der Alveolarepithelzellen ausmachen (Crapo et al. 1982). AT I Zellen sind ausdifferenziert und mitose-inaktiv. Sie sind durch eine geringe Anzahl von Organellen gekennzeichnet. Bisher sind nur wenige spezifische Marker für diesen Zelltyp bekannt, was eine weitere Charakterisierung schwierig gestaltete. Allerdings werden momentan weitere Funktionen, wie die Rückgewinnung von Proteinen, sowie von Flüssigkeiten aus dem Alveolarlumen über die AT I Zellen untersucht (Borok et al. 2002; Johnson et al. 2002; Kim and Malik 2003). Im Gegensatz dazu sind die AT II Zellen ausführlicher beschrieben. Diese quaderförmigen Zellen werden auch als Nischenzellen bezeichnet, da sie sich in den Winkeln der Alveolen befinden (Abb. 4).

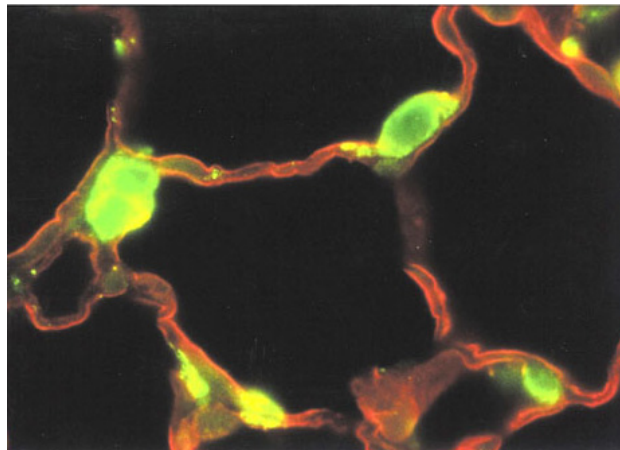


Abbildung 4. Immunfluoreszenzfärbung eines Lungenparaffinschnitts der Ratte: die in den Ecken liegenden AT II Zellen wurden gegen Surfactant Protein D (grüne Fluoreszenz) gefärbt, die langgestreckten AT I Zellen wurden durch *Lycopersicon esculentum* Agglutinin (rote Fluoreszenz) angefärbt (Abbildung übernommen von (Fehrenbach 2001)).

Sie machen ungefähr 60 % der Alveolarepithelzellen aus, wobei sie nur die restlichen 5 % der Alveolaroberfläche bedecken. Die AT II Zellen besitzen charakteristische Organellen, die „Lamellar Bodies“, die die sekretorischen Granula des Surfactant darstellen (MACKLIN 1954; Phelps and Floros 1991). Das Surfactant bildet ein Gemisch aus 90 % Lipiden und 10 % Surfactant-assoziierten Proteinen (Griese 1999). Es mindert die Oberflächenspannung an der sehr großen Gewebe-Luft-Grenzfläche und verhindert so das Zusammenfallen der Alveolen während der Ausatmung (Hills 1999; Nicholas 1996). Die AT II Zellen gelten als Stammzell-Population des Alveolarepithels (Kapanci et al. 1969; Uhal 1997). Sie können proliferieren und gelten als Vorläuferzellen der AT I Zellen. Diese selbst können durch ihre Organellenarmut kaum zelluläre Schäden beheben, so dass sie leicht durch toxische endogene oder exogene Einflüsse irreversibel geschädigt werden (Weibel 1971). In einem solchen Fall wird die Proliferation der AT II ausgelöst, die dann in AT I Zellen differenzieren können (Brody and Williams 1992; Evans et al. 1975). Die molekulare Regulation dieser komplexen Vorgänge, die den Schlüssel von Lungenentwicklung und Heilungsprozessen darstellen, ist noch vollkommen unbekannt (Williams MC, Annu Rev Physiol, 2003, 669), so dass die Identifizierung von Faktoren, die an der Alveolarhomöostase beteiligt sind, ein vorrangiges Ziel darstellt.

1.5 Zielsetzung und Arbeitsprogramm

Für die Aufklärung und Bestimmung der physiologischen Rolle von RAGE wurden zwei wesentliche Aspekte untersucht.

Zum einen sollte durch qualitative und quantitative Bestimmung der Bindungskapazität die physiologische und pathophysiologische Relevanz bereits bekannter Liganden an RAGE evaluiert werden.

Darüber hinaus hieß die vornehmliche Zielstellung, die Bedeutung von RAGE in Lungengewebe, einem Organ, dem bisher trotz der bekannten Expression von RAGE wenig Beachtung beigemessen wurde, zu analysieren. Besonderes Augenmerk wurde in diesem Zusammenhang auf eine mögliche neue physiologische Funktion von RAGE gelegt, um die beschriebenen physiologischen und vor allem weitreichenden pathologischen Aspekte von RAGE einordnen und ergänzen zu können.

Charakterisierung der Bindung definierter AGEs an RAGE

Die Vielzahl verschiedener AGE-Modifikationen ließ die Frage aufkommen, ob allen die gleiche Fähigkeit zukommt, RAGE zu binden und damit Erkrankungen auszulösen, bzw. bereits bestehende Krankheitsbilder zu verschlechtern. Bisher gibt es allerdings weder eine universell anerkannte Methode zur Detektion von AGEs, noch interne Standards für die Klassifikation der heterogenen Modifizierungen oder eine international verwendete Maßeinheit (Singh et al. 2001). Ein Ziel war es deswegen in Zusammenarbeit mit dem Institut für Lebensmittelchemie der TU Dresden und dem Institut für Polymerforschung e.V. langfristig einen „Biosensor“ für AGEs zu generieren. Hierfür mussten Bindungsexperimente etabliert werden, um die Affinität verschiedener, chemisch genau definierter AGEs an RAGE untersuchen zu können und somit potentiell „schädliche“ AGEs zu erkennen. Weiterhin sollten diese Experimente dazu dienen, eine Korrelation zwischen Art der AGE-Modifikation und / oder Konzentration des AGE-Gehalts und bestimmten Krankheitsbildern zeigen zu können. Den Lebensmittelchemikern kam dabei die Synthese AGE-modifizierter Moleküle zu. Die Polymerforscher übernahmen die Entwicklung geeigneter Trägermaterialien für die Immobilisierung des Rezeptors. Im Rahmen der Doktorarbeit beinhaltete meine Aufgabe, molekularbiologische Methoden zur Expression und biochemische Methoden zur Reinigung von löslichem RAGE

(sRAGE), sowie die Expression von membranständigem RAGE (flRAGE), zu planen. Beide Konstrukte sollten in einem geeigneten Zellsystem exprimiert werden. Für den Einsatz des sRAGE in Festphasen-Bindungsexperimenten musste zunächst die Reinigung des Proteins etabliert werden. Neben dem Einsatz in Bindungsexperimenten war beabsichtigt, das gereinigte sRAGE-Protein für die Herstellung hoch spezifischer monoklonaler anti-RAGE-Antikörper zu nutzen. Diese sollten einerseits für die Detektion von RAGE im Gewebe, andererseits in Funktionsanalysen z.B. als Blockierungsreagenz eingesetzt werden. Ein weiteres Ziel beinhaltete die Untersuchung der Funktionalität des membranständigen Rezeptors über den Nachweis der Bindung von Liganden, indem Digoxigenin-markierte AGEs eingesetzt wurden. Deren Interaktion mit RAGE sollte mittels FACS Analysen oder Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden. Eine alternative Möglichkeit des Funktionsnachweises von flRAGE boten Zell-Aktivierungsstudien, wobei die für RAGE-AGE-Interaktionen beschriebene NF κ B-Aktivierung mittels EMSA (electrophoretic mobility shift assay) untersucht wurde, oder die Phosphorylierung der in der Signalkaskade vorgeschalteten MAP- (Mitogen-aktivierte Protein-) Kinasen mittels Western Blot detektiert werden sollte.

Bedeutung der hohen Expressionsstärke in Lungengewebe

RAGE wurde ursprünglich aus der Lunge isoliert, da dieser als endothelreiches Gewebe auch eine hohe Expression dieses hauptsächlich auf Endothelzellen beschriebenen Rezeptors vorausgesagt wurde. Jedoch kommt den AGEs in der Lunge keine bedeutende Rolle zu, so dass es parallel zu der Charakterisierung der AGE-RAGE-Interaktion das vorrangige Ziel war, die bisher in der Literatur vollkommen vernachlässigte Frage nach der physiologischen Funktion von RAGE an dieser Stelle zu klären. Hierfür sollte zunächst die Gewebeverteilung mittels der hochsensitiven Methode der quantifizierenden „real time“ RT-PCR überprüft werden. Mit Hilfe der neu generierten monoklonalen Antikörper sollte der Nachweis der Korrelation von *RAGE*-Transkriptmengen und Protein erfolgen. Es war geplant, zunächst gesamtes Lungenlysat im Western Blot zu analysieren. Um eine mögliche physiologische Funktion von RAGE in der Lunge definieren zu können, sollte ebenfalls unter Verwendung der neu generierten monoklonalen anti-RAGE-Antikörper die zelluläre und subzelluläre Lokalisation des Rezeptors ermittelt werden. Die Durchführung von Immunfluoreszenz- sowie immunhistochemischen

Untersuchungen von Lungengefrierschnitten wurde hierfür in Erwägung gezogen. Die Expressionsprodukte der durch molekularbiologische Methoden hergestellten RAGE-Konstrukte (siehe vorher) standen schließlich für Funktionsanalysen zur Verfügung. Es war z.B. beabsichtigt, in Bindungsstudien mit RAGE-transfizierten Zellen oder gereinigtem sRAGE zu untersuchen, ob RAGE spezifisch mit in der Lunge vorkommenden Molekülen oder Zellen interagiert und ob dies in Zusammenhang mit bisher für RAGE beschriebenen Eigenschaften als Signaltransduktionsrezeptor oder als Gegenrezeptor für Leukozytenintegrine steht. Darüber hinaus sollte die mögliche Beteiligung von RAGE an weiteren Prozessen erörtert werden. In Betrachtung gezogen wurden z.B. Transportprozesse, die durch Internalisierungsexperimente untersucht werden konnten, oder die Vermittlung von Zelladhärenz, wofür Kinetikuntersuchungen angedacht waren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Die Chemikalien wurden im Allgemeinen von Sigma (Taufkirchen), Merck AG (Darmstadt), Gerbu (Gaiberg) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Bei Verwendung anderer Hersteller wurde dies angegeben.

2.1.2 Lösungen und Puffer

Anodenpuffer 1	300 mM Tris-Base 20 % Methanol (v/v)
Anodenpuffer 2	25 mM Tris-Base 20 % Methanol (v/v)
Beschichtungspuffer	50 mM NaHCO ₃ , pH 9,5
BSF	137 mM NaCl 5 mM KCl 0,7 mM Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O 10 mM HEPES 5,5 mM Glukose, pH 7.4
Calcium-Bindungspuffer	20 mM Hepes, pH 7,5 150 mM NaCl 5 mM KCl 1,2 mM MgCl ₂ 1,3 mM CaCl ₂
Coomassie-Entfärbelösung	10 % Eisessig (v/v) 10 % 2-Propanol (v/v)
Coomassie-Färbelösung	10 % Eisessig (v/v) 40 % Methanol (v/v) 0,1 % Coomassie Brilliant Blue G250 (Fluka, Steinheim)
EMSA-Ladepuffer	25 % Glycerol (v/v) 0,05 % Bromphenolblau (w/v) 0,05 % Xylenxyanolblau (w/v)
EMSA-Puffer A	10 mM HEPES-KOH, pH 7,9 bei 4°C 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 0,5 mM DTT 0,2 mM PMSF

EMSA-Puffer C	20 mM HEPES-KOH, pH 7,9 bei 4°C 25 % Glycerol (v/v) 420 mM NaCl 1,5 mM MgCl ₂ 0,2 mM EDTA 0,5 mM DTT 0,7 mM PMSF
Gelfixierungslösung	10 % Eisessig (v/v) 50 % Methanol (v/v)
6 x Gelladepuffer	30 % Glyzerin (v/v) 0,25 % Bromphenolblau (w/v) 0,25 % Xylenxyanol FF (w/v) (Fluka)
Geltrocknungslösung	7 % Eisessig (v/v) 1 % Glyzerin (v/v) 7 % Methanol (v/v)
Immunogold-Blockierung	0,5 % (w/v) Fischgelatine 0,5 % (w/v) BSA 0,01 % Tween 20 in PBS
Immunogold-Fixierung	4 % Formaldehyd (w/v) 0,05 % Glutaraldehyd (w/v) in 0,1 M Natrium Cacodylate Puffer, pH 7.2
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base 40 mM 6-Aminocaprinsäure (Fluka) 20 % Methanol (v/v)
Lysepuffer für Säugerzellen	50 mM Tris-HCl (pH 8.0) 300 mM NaCl 2 mM EDTA 1 % NP-40 Protease inhibitor Tablette (1 Tablette/ 10 ml Puffer; Roche)
Lysepuffer für Lungengewebe	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 1 mM EDTA 1 mM PMSF 1 % (v/v) Triton X-100 1 % (w/v) Natriumdesoxycholat 0.1 % (w/v) SDS Protease inhibitor Tablette (1 Tablette/ 10 ml Puffer)

Lysozymlösung	10 mg /ml Hühnereiweißlysozym in 10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
MC-Elutionspuffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, pH 8,0 50-250 mM Imidazol (Roth, Karlsruhe)
MC-Puffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, pH 8,0 5 mM Imidazol
NFκB-Bindungspuffer	10 mM HEPES, pH 7,5 0,1 mM EDTA 100 mM NaCl 1 mM ZnCl ₂ 4 mM MgCl ₂ 2 mM DTT 17,5 % Glycerol (v/v) 1 mg/ ml BSA (DNase-frei)
PBS	9,55 g/ l PBS Trockensubstanz (Biochrom, Berlin)
RNase-Lösung	2 mg/ ml RNase A (Roche, Mannheim) in 10 mM Tris- HCl, 15 mM NaCl, pH 7,5, 8000 U RNase T1 (Roche)
5 x SDS-Probenpuffer	50 % Glyzerin (v/v) 15 % SDS (w/v) 15 % 2-Mercaptoethanol (v/v) 0,15 % Bromphenolblau (w/v)
STET-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA 0,1 M NaCl 5 % Triton X-100 (v/v)
T4 Polynukleotidkinase-Puffer 10x	700 mM Tris-HCl, pH 7,6 100 mM MgCl ₂ 50 mM DTT
TBE-Puffer	89 mM Tris-HCl, pH 8,0 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
TBS	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBSTT	TBS 0,05 % Tween-20 (v/v) (Serva) 0,2 % Triton X-100 (v/v)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA

Waschpuffer (ELISA)	PBS 0,1 % Tween 20 (v/v)
---------------------	-----------------------------

2.1.3 Kulturmedien

LB-Medium	1 % Trypton (w/v) (Becton Dickinson) 0,5 % Hefeextrakt (w/v) (Becton Dickinson) 1 % NaCl (w/v) pH 7,0
LB-Agar	LB-Medium 15 g/l Agarose (Becton Dickinson)
D-MEM	D-MEM high glucose (4500 mg/ml) (Invitrogen) 10 % FKS (v/v) 100 µg/ml Penicillin/ Streptomycin
RPMI	RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 1 mM Natriumpyruvat 1 x nichtessentielle Aminosäuren 10 % FKS (v/v) 100 µg/ml Penicillin/ Streptomycin (alle Substanzen von Biochrom)
M199	Medium 199 (GibcoBrl) 20 % (v/v) Humanserum 25 U/ml Penicillin G 25 µg/ml Streptomycinsulfat
Endothelzell-Medium	EBM-2 (Clonetics, USA) EGM-2 MV Zusätze (Clonetics) 5 % FKS (v/v)
SAGM Medium	SAGM (CellSystems) 1 % (v/v) FKS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin

2.1.4 Zelllinien

Die Zelllinien HEK293, HEK293 T, Molt, Jurkat und THP-1 wurden von der Sammlung für Zelllinien und Hybridome „American Type Culture Collection“ (ATCC; Manassas, VA, USA) oder der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die Primärzelllinie HMVEC-L (humane mikrovaskuläre Endothelzellen der Lunge) und die Primärzelllinie NHLF (normale humane Lungenfibroblasten) wurden von Clonetics/ BioWhittaker (Verviers, Belgien) bestellt.

Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Name	Zellkatalog	Morphologie	Ursprung
HEK293	ATCC CRL-1573	adhärent, epithelial	humanes, embryonales Nierengewebe
MOLT-4	ATCC CRL-1582	Suspension	humane akute T-Lymphoblastoide Leukämie
Jurkat	DSMZ ACC 282	Suspension	humane akute T-Lymphoblastoide Leukämie
THP-1	DSMZ ACC 16	Suspension	humane akute monozytoide Leukämie
NHLF	Clonetics CC-2512	adhärent, Fibroblasten-artig	humanes Lungengewebe; Primärzelllinie
HMVEC-L	Clonetics CC-2527	adhärent, endothelial	humanes Lungengewebe, Primärzelllinie Zusatz von Wachstumsfaktoren zu Kulturmedium (hFGF)

Tabelle 2 : Ursprung und Merkmale der Zelllinien

2.1.5 Weitere Materialien

Alle weiteren Materialien wie Chemikalien, Antikörper, Kitsysteme und Gerätschaften sind im Rahmen der Methodenbeschreibungen angegeben.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden ausgewählte DNA Sequenzen spezifisch anhand von zwei Oligonukleotiden, die am 5'- bzw. 3'-Ende des gewünschten DNA-Stücks binden, amplifiziert. Die verwendeten Oligonukleotide, oder Primer sind in den entsprechenden Kapiteln angegeben. Für die Reaktion wurde standardmäßig Titanium Taq Polymerase (BD Clontech) eingesetzt. Für die Amplifikation von DNA-Sequenzen mit höherer Genauigkeit, zum Beispiel die DNA der Expressionsprodukte, wurde Advantage 2 High Fidelity (HF) Polymerase (BD Clontech) benutzt, da diese eine Korrekturlesefunktion aufweist. Die PCR wurde in 25 µl Ansätzen mit je 0,5 µM Oligonukleotidprimern, 1 mM dNTP (MBI Fermentas), 1x Reaktionspuffer und Taq Polymerase in 200 µl Reaktionsgefäßen (Eppendorf) in dem UNO II Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt.

2.2.2 Restriktionsverdau von DNA

Für analytische und präparative Zwecke wurde die DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen verschiedener Hersteller (Amersham Biosciences,

Freiburg, MBI Fermentas, St. Leon-Roth) in definierte Fragmente geschnitten. Die Verdaubedingungen und Puffer wurden den Angaben der jeweiligen Hersteller entnommen. Die Konzentration der eingesetzten Enzyme betrug mindestens 1 U/ μg zu verdauender DNA, die Verdauzeit normalerweise 1 h, die Verdautemperatur war vom jeweiligen Enzym abhängig.

2.2.3 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die PCR-Produkte wandern aufgrund ihres Molekulargewichts unterschiedlich schnell in einem horizontalen Agarosegel, an das ein Spannungsfeld angelegt wird. Somit können unterschiedlich lange DNA Fragmente elektrophoretisch getrennt werden. Je nach Länge der zu trennenden Produkte wurde die Agarose (Serva) in einer Konzentration von 0,8–1,5 % (w/v) in 0,5 x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlen mit 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid versetzt, um die DNA Fragmente im Gel detektieren zu können. Die so behandelte Agarose wurde in die Gelträger-Apparaturen gegossen. Die Proben und der Molekulargewichtsmarker (100 Basenpaar (bp), bzw. 1 (Kilobasen) kb DNA-Leiter; Invitrogen) wurden mit 1/ 6 des Gesamtprobenvolumens 6x Gelladepuffers versetzt. Das mit den Proben beladene Gel wurde in die mit 0,5 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (Amersham) überführt und die Elektrophorese wurde für 0,5 h bis 1,5 h bei einer maximalen Spannung von 7 V/ cm Elektrodendistanz durchgeführt. Für die Gelauswertung wurde ein UV-Transilluminator (Biostep, Jahnsdorf) verwendet.

2.2.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die durch die Agarosegelelektrophorese getrennten DNA Sequenzen wurden mit einem sauberen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem QiaQuickTM Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden) oder dem Invisorb Spin DNA Extraction Kit von Invitex (Berlin) nach den Protokollen der Hersteller isoliert. Die DNA wurde mit H₂O von den in den Kits enthaltenen Säulen eluiert und bei -20°C gelagert.

2.2.5 Klonierung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers in die Vektoren pCR2.1-TOPO bzw. pCRII-TOPO kloniert, wobei der durch die Taq-Polymerase an den 3'-Enden der PCR-Produkte

angehängte Desoxyadenosin-Rest mit den 3'-seitigen überhängenden Desoxythymidin-Resten des linearisierten Vektors mit Hilfe des vektorgekoppelten Enzyms Topoisomerase I ligiert wird.

DNA-Fragmente, die durch Behandlung mit Restriktionsendonukleasen überhängende oder glatte Enden aufwiesen, wurden mittels Fast-Link Ligase (MBI Fermentas) in die Restriktionsschnittstellen der entsprechenden Vektoren kloniert. Die Ligation erfolgte laut Angaben des Herstellers in 15 – 30 min bei RT, danach wurde die Enzymaktivität bei 70°C für 15 min inaktiviert. Es wurde ein drei- bis fünffacher Überschuss an Fragment-DNA im Verhältnis zur Vektor-DNA verwendet.

2.2.5.1 Klonierung von sRAGE

Die Sequenz, die für humanen löslichen RAGE (sRAGE) kodiert, bestehend aus den Aminosäuren 22-342, wurde aus einer humanen Lungen-cDNA Bibliothek (Clontech, Palo Alto, CA, USA) kloniert. Spezifische Primer wurden so ausgewählt, dass mittels PCR aminoterminal (N-terminal) die Restriktionsschnittstelle *Sfi*I und carboxyterminal (C-terminal) *Eco*RI eingefügt wurde. Außerdem wurden über den C-terminalen Primer ein His₆-Tag und ein Stop-Codon inseriert. Der Vorwärts-Primer hat die Bezeichnung RAN20: 5'GCGGCCCGAGCCGGCCGGTGCTCAAAACATCACAGCC 3'; der Rückwärtsprimer wurde RA15 genannt: 5' CACGAATTCTCAGTGATGGTGATGGTGATGGGCTAG AGTTCCCAGCCCCTGA 3'. Die Restriktionsschnittstellen sind kursiv gedruckt, die Sequenz des His₆-Tags ist durch Unterstreichen gekennzeichnet, die unterstrichene und kursiv gedruckte Sequenz des Rückwärts-Primes markiert das Stop-Codon.

Das so gewonnene PCR-Produkt wurde in den Expressionsvektor pSecTag2B (Invitrogen, Carlsbad, CA, Germany) einkloniert. Hauptmerkmal dieses Vektors ist die murine Ig κ -leader Sequenz, die vor der „Multiple Cloning Site“ (MCS) des Vektors lokalisiert ist. Sie ermöglicht die Sekretion des exprimierten Zielproteins, in diesem Fall sRAGE, in das Zellkulturmedium (Vektorkarte pSecTag2B-sRAGE: siehe Anhang).

2.2.5.2 Klonierung von fIRAGE

Die humane cDNA, bestehend aus der vollständigen Sequenz des Rezeptors, wurde ebenfalls aus einer Lungen-cDNA Bibliothek (Clontech, Palo Alto, CA, USA) kloniert und mit Hilfe konventioneller PCR-Techniken unter Verwendung spezifischer Primer

amplifiziert. Folgende Primer wurden für dieses „full length“ RAGE-Konstrukt (fIRAGE) gewählt: Vorwärts-Primer: RAN13: 5' CACGCTAGCATGGCAGCCGGAACAGCAGTTGGA und Rückwärts-Primer: RAC13: 5' GTGGAATTCTCAAGGCCCTCCAGTACTACTCTCG. Die fIRAGE-Primer führten die Restriktionsschnittstellen *NheI* am N-Terminus und *EcoRI* am C-Terminus ein, deren Sequenzen hier kursiv gekennzeichnet sind. Diese ermöglichten die Klonierung der fIRAGE-Sequenz in die Expressionsvektoren pcDNA 3.1+ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) und pIRES2EGFP (Clontech). (Vektorkarten pflRAGE-IRES2-EGFP und pcDNA3.1-fIRAGE: siehe Anhang)

2.2.6 Transformation von DNA in kompetente Bakterien und Kultivierung

Die Transformation der Ligationsansätze erfolgte entweder in die TOPO TA Cloning Kit enthaltenen kompetenten Bakterien des *E. coli* Stammes TO10F' oder XL1-blue (Stratagene), die nach der Methode von (Hanahan 1983) chemisch kompetent gemacht wurden. Der Ligationsansatz wurde zu einem 100 µl Bakterienaliquot gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s und daraufhin eine weitere Inkubation für 2 min auf Eis. Die so behandelten Bakterien wurden in 1 ml LB-Medium für 1 h bei 37°C im Schüttler inkubiert, danach auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum und im Falle der Bakterien des TOPO TA Cloning Kits mit IPTG (Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid) und X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactosid) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Nach einer Inkubationszeit von 12-16 h wurden einzeln liegende Bakterienkolonien mit sterilen Zahnstochern gepickt und zum Animpfen von 5 ml LB-Kulturen mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen verwendet. Diese Bakterienkulturen wurden wiederum bei 37°C im Bakterienschüttler über Nacht inkubiert. 1,5 ml der Über-Nacht-Kulturen wurden zentrifugiert (1 min, 14000 x g, RT) und für die Präparation der Plasmid-DNA verwendet.

2.2.7 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Die Minipräparation der Plasmid-DNA erfolgte leicht modifiziert nach der Methode von Holmes und Quigley (1981). Die Bakteriensedimente wurden in 350 µl STET-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 25 µl Lysozymlösung für 40 s aufgekocht und abzentrifugiert (10 min, 14000 x g, RT). Das Sediment der Zelltrümmer wurde

mit einem sterilen Zahnstocher entfernt, und die Plasmid-DNA wurde aus dem Überstand durch Zugabe von 40 µl einer 2,5 M Lösung von Natriumacetat (pH 5,2) und 420 µl 2-Propanol und Inkubation von 5 min bei RT gefällt. Die gefällte DNA wurde sedimentiert (10 min, 14000 x g, 4°C), mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und wie vorher erneut sedimentiert. Nach Entfernung des Ethanols durch Lufttrocknen wurde die Plasmid-DNA in 50 µl H₂O aufgenommen und vorhandene RNA wurde durch Zusatz von 1 µl RNase-Lösung verdaut. 5 µl der gelösten Plasmid-DNA wurden zur Analyse des Inserts mittels eines Restriktionsverdaus herangezogen.

Anhand des Kontrollverdaus ausgewählte Klone wurden zum Animpfen von 100 ml LB-Kulturen mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen verwendet und nach Inkubation über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator zur Maxi-Präparation der Plasmid-DNA herangezogen. Für die Gewinnung der Plasmid-DNA wurde das Invisorb Plasmid Maxi Kit (Invitek, Berlin) genau nach Anleitung verwendet.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration und der Reinheit erfolgten durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm bzw. des Verhältnisses von OD_{260 nm}/ OD_{280 nm} an einem Spektralphotometer (BioPhotometer; Eppendorf, Hamburg) unter Verwendung spezieller Kunststoffküvetten (Eppendorf). Eine OD_{260 nm} = 1 entspricht 50 µg DNA/ ml, 40 µg RNA/ ml bzw. 30 µg Oligonukleotide/ ml.

2.2.8 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Klonierte PCR-Produkte und Vektorkonstrukte wurden unter Voraussetzung des Vorhandenseins entsprechender Bindungsstellen für den Cy5.0 M13 -40 „forward“-Primer und den M13 „reverse“-Primer (Amersham Biosciences), mittels des Thermo Sequenase Primer Cycle Sequencing Kits (Amersham Biosciences) durch die Kettenabbruchmethode nach dem Originalprotokoll des Herstellers auf beiden DNA-Strängen sequenziert. Zur Analyse der Proben diente ein automatischer DNA-Sequenzierer (ALFexpress; Amersham). Für die elektrophoretische Auftrennung der Produkte (Laufzeit: 900 min, Spannung: 1500 V, Stromstärke: 60 mA, Leistung: 25 W, Temperatur: 55°C, „sample interval“: 2 s) wurde ein spezielles Polyacrylamidgel verwendet, dessen Polymerisation durch UV-Exposition ausgelöst wird (ReproGel Long Read; Amersham). Bei großen Inserts und der Notwendigkeit der Verwendung von insertspezifischen Primern wurde außerdem der kommerzielle Sequenzierservice der Firma GATC Biotech AG (Konstanz) in Anspruch genommen.

2.2.9 RNA-Isolierung aus Zellen

Für die RNA-Extraktion wurden ungefähr 5×10^6 Zellen in 1 ml TriPure[®] Isolation Reagent (ehemals Boehringer, Mannheim) aufgenommen und nach den Angaben des Herstellers behandelt. Die isolierte RNA wurde in Diethylpyrocarbonate (DEPC) –behandeltem RNase-freiem H₂O aufgenommen und die Reinheit der RNA wurde durch die spektrophotometrische Bestimmung des Verhältnisses von OD_{260 nm}/ OD_{280 nm} untersucht. Mögliche genomische DNA Kontaminationen wurden mittels DNase I (MBI Fermentas) nach Originalprotokoll des Herstellers verdaut. Die RNA wurde entweder direkt für die Umschreibung eingesetzt oder langfristig bei – 80°C gelagert.

2.2.10 Reverse Transkription von mRNA

Die Umschreibung der DNA-freien mRNA in cDNA erfolgt mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase. 1 µg der Gesamt-RNA wurde zur cDNA-Synthese unter Verwendung des Oligo(dT)₁₈-Primers mit Hilfe des RT-for-PCR Kits (BD Clontech, Hamburg) eingesetzt. Den Anweisungen des Herstellers wurde strikt gefolgt. Die cDNA wurde in DEPC-H₂O verdünnt und in Aliquots bei -80°C gelagert.

2.2.11 Quantitative „real time“ RT-PCR

Diese Methode erlaubt nicht nur die Untersuchung des Vorhandenseins einer bestimmten DNA-Sequenz in einer Probe wie herkömmliche PCRs, sie ermöglicht die Quantifizierung der Ausgangs-cDNA Menge in einer Probe und ermöglicht so den Vergleich der Expressionsstärke in verschiedenen Proben.

Die mRNA-Expression der Gene *GAPDH* (Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) und *RAGE* wurde mit Hilfe des „Light Cycler“ (LC)-Instruments (Roche Diagnostics) quantitativ bestimmt. Hierfür wurden „real time“-PCR Assays auf der Grundlage der Detektion des DNA-interkalierenden Farbstoffes SYBR Green I, der von der optischen Einheit des Geräts nach jedem Zyklus detektiert wird, durchgeführt. Für die „real time“ RT-PCR-Analysen wurde die Reagenzien des LC-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics), der eine „hot start“-PCR zur Verminderung von Primerdimeren ermöglicht, nach den Angaben des Herstellers verwendet. In einem 20 µl Reaktionsansatz wurden 10 % DNA Master SYBR Green I Mastermix, je nach verwendetem Primerpaar 4-5 mM MgCl₂, 0,5 µM jedes Primers und 2 µl cDNA verwendet. Entsprechend der Probenzahl wurde ein Mastermix aller Reagenzien außer der cDNA angefertigt, um

durch Pipettierfehler hervorgerufene Schwankungen zu minimieren. Bei jeder PCR-Analyse wurde ein Ansatz ohne cDNA mitgeführt, um DNA Kontaminationen, die bei dieser hoch sensitiven Methode zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnten, auszuschließen. Die $MgCl_2$ -Konzentration sowie die Primer-„annealing“-Temperatur wurde für jedes Primerpaar separat etabliert, so dass jeweils die niedrigsten „crossing points“ (Cp), die höchste Fluoreszenzintensität und der steilste Anstieg der Fluoreszenzintensität erzielt wurde, und Primerdimere, sowie unspezifische Amplifikationsprodukte vermieden wurden.

Die „real time“ RT-PCR-Assays zur Untersuchung der verschiedenen Gene bestanden generell aus einer initialen Denaturierung (10 min, 95°C) sowie 40 Amplifikationszyklen bestehend aus Denaturierung (15 s, 95°C), „annealing“ (5 s, Temperatur je nach Primerpaar variabel), Elongation (Zeit je nach Produktlänge variabel, 72°C) sowie einer Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte. Bei dieser Analyse wird durch stufenloses Erhitzen der PCR-Proben (0,2°C/ s; von 70°C auf 95°C) die Doppelstrang-DNA denaturiert, wodurch die interkalierten SYBR Green Moleküle aus der DNA freigesetzt werden, und somit die Fluoreszenzintensität langsam abnimmt. Bei Erreichen des Schmelzpunktes der DNA-Probe nimmt die Fluoreszenz abrupt ab. Diesen Schmelzpunkt kann man anhand der durch die Software ermittelten Schmelzkurve identifizieren. Bei Vorhandensein unspezifischer PCR-Produkte könnte man dies mit Hilfe der Schmelzkurven-Analyse durch Auftreten divergierender Schmelzpunkte nachweisen. Die zur Amplifikation der verschiedenen Sequenzen eingesetzten Primer, die einzelnen Stufen der Amplifikationszyklen, sowie die $MgCl_2$ -Konzentrationen sind in der Tabelle 3 aufgelistet.

Die Expression von *RAGE* wurde zum einen in verschiedenen humanen Geweben untersucht. Hierfür wurde die cDNA der Normalgewebe von BD Clontech bezogen („Multiple Tissue cDNA Panel“ I und II). Die cDNA jedes Gewebes war hier aus mehreren gesunden Spendern (2-45) zusammengefaßt, so dass individuelle Schwankungen der Expressionsstärke relativiert werden konnten. Weiterhin wurden die cDNA-Proben dieser „Panel“ bereits gegen die Expression von vier Haushaltsgenen (*GAPDH*, β -Aktin, α -Tubulin und *Phospholipase A2*) normalisiert und konnten somit direkt in der Expressionsstärke der untersuchten Gene verglichen werden. Zum anderen wurde die *RAGE*-Expression in verschiedenen Primärzellen wie Endothelzellen und Alveolarepithelzellen, sowie in der mit der *RAGE*-Sequenz transfizierten humanen Zelllinie HEK293 und HEK293 Wildtyp (wt) und darüber

hinaus in cDNA-Proben aus entzündetem (M. Crohn) Gewebe untersucht und verglichen. Die Bestimmung der absoluten Kopienzahl der spezifischen cDNAs in den einzelnen Proben wurde durch eine Amplifikation von Standards mit bekannter Molekülzahl zwischen 10^1 und 10^8 / Kapillare im gleichen LC-Lauf (externe Standards) ermöglicht. Die Plasmidstandards wurden durch Klonierung der spezifischen DNA-Sequenzen in den PCR-Vektor pCR2.1-TOPO, anschließende Transformation und Plasmid-Maxi-Präparation erhalten (siehe 2.2.5 – 2.2.7) und so verdünnt, dass entsprechende Molekülzahlen erhalten wurden. Mit Hilfe der LC-Software (Version 3.5, Modus „fit points“; Roche Diagnostics) konnten jeweils Standardkurven durch die lineare Regression der Cp-Werte der Standards gegen den Logarithmus der Standardkonzentrationen (Regressionskoeffizient = 1,0; mittlerer quadratischer Fehler < 0,15) erstellt werden, die eine Berechnung der Kopienzahl in den zu untersuchenden cDNA-Proben ermöglichten.

Es wurden für jede cDNA-Probe und untersuchte Targetsequenz zwei LC-Läufe durchgeführt, wobei in jedem Lauf eine eigene Standardreihe und eine Negativkontrolle ohne cDNA mitgeführt wurden.

Die Normalisierung der Expressionsstärke von *RAGE* in den Primärzellen und Zelllinien erfolgte anhand der Expression des Haushaltsgens *GAPDH*.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen jeweils den Mittelwert der doppelt durchgeführten Experimente und deren Mittelabweichung.

Bezeichnung	Sequenz	PCR-Zyklen	Produktgröße [bp]
RAqu_2 for RAqu_2 rev	5'-TCCAATTGGTGGTGGAGCCAGAA-3' 5'-TCGCCTGGTTCGATGATGCTGAT-3'	40 Zyklen: 95°C, 15 s, 68°C 5 s, 72°C, 10 s	262
RAqu_3 for RAqu_3 rev	5'-CAGTTGGAGCCTGGGTGCTGGT-3' 5'-AGGGAGCCGTTGGGAAGGACAC-3'	40 Zyklen: 95°C, 15 s, 68°C 5 s, 72°C, 10 s	235
GAPDH for GAPDH rev	5'-AACAGCGACACCCACTCCTC-3' 5'-GGAGGGGAGATTGAGTGTGGT-3'	40 Zyklen: 95°C, 15 s, 65°C 5 s, 72°C, 10 s	262

Tabelle 3 zeigt die für die „real time“ PCR verwendeten Primer

2.2.12 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Bei der Natriumlaurylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt, so dass auch komplexe Proteinmischungen untersucht werden können. Die meisten Proteine binden die Anionen des SDS proportional zu ihrer Molekülgröße, wobei die Eigenladung des Proteins

vernachlässigbar klein ist. Zur Auftrennung der Proteine wurde das Tris-HCl/ Tris-Glycin-Puffersystem nach der Methode von Laemmli angewendet (Laemmli 1970). Die Konzentration von Acrylamid/ N, N'-Methylenbisacrylamid (19:1; 40 %-ige Stammlösung; Gerbu) im Trenngel wurde je nach Molekulargewicht des zu untersuchenden Proteins gewählt und variierte zwischen 8 % und 12 % (v/v). Als Gelapparaturen dienten Mini-PROTEAN II- und III-Kammern (BioRad). Für die Elektrophorese wurden die Proben mit 5 x SDS-Probenpuffer (reduzierend: mit 2-Mercaptoethanol; nicht reduzierend: ohne 2-Mercaptoethanol) (1/5 des Gesamtvolumens) versetzt und 5–10 min bei 95°C inkubiert. Die Elektrophorese wurde bei 80 V im Sammelgel und 120 V im Trenngel durchgeführt. Zur Identifizierung der Molekulargewichtsgrößen der Proteine wurden die Molekulargewichts- (MW) Standards Precision Plus Protein Standard Dual Color (BioRad) oder Rainbow Coloured Protein Molecular Weight Marker (Amersham Biosciences) auf das gleiche Gel wie die zu untersuchenden Proben aufgetragen. Die aufgetrennten Proteine konnten in den Gelen durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G250 sichtbar gemacht werden. Dafür wurden die Gele ungefähr 2 h in Coomassie-Färbelösung geschüttelt und anschließend für mehrere Stunden unter mehrfachem Wechseln der Coomassie-Entfärbelösung inkubiert.

2.2.13 Western-Blot und immunchemischer Nachweis

Die während der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine können mit dieser Methode spezifisch nachgewiesen werden. Dafür wurden die Proteine von dem Gel durch einen Elektrotransfer mittels der Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell-Apparatur (BioRad) auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membran (Fluorotrans Transfer Membrane; Pall; Portsmouth, England) übertragen und immobilisiert. Für den Transfer wurden Filterpapiere, Gel und Membran in einem Blot-„Sandwich“ angeordnet: auf die Anode der Apparatur wurden zunächst vier in Anodenpuffer 1 getränkte Filterpapiere, darauf vier weitere, in Anodenpuffer 2 getränkte Filterpapiere gelegt. Es folgte die Membran, die zunächst in Methanol inkubiert und anschließend in Anodenpuffer 2 äquilibriert wurde, das Gel und acht mit Kathodenpuffer befeuchtete Filterpapiere. Nach Anbringen der Kathode erfolgte der Transfer bei 25 V für 2 h. Anschließend wurde die PVDF-Membran in 3 % BSA (w/v) in TBS über Nacht bei 4°C inkubiert, um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern. Nach Waschschritten mit TBSTT und TBS erfolgte die Inkubation mit

dem Primärantikörper für 1 h bei Raumtemperatur (RT). Ungebundener, überschüssiger Primärantikörper wurde durch zwei Waschschriffe mit TBSTT und einem weiteren mit TBS entfernt. Zur Visualisierung der Primärantikörper-Bindung diente ein Meerrettich-Peroxidase- (HRP) markierter Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichtet war (Ziege-anti-Maus-HRP oder Kaninchen-anti-Ziege-HRP; DAKO, Darmstadt). Der Nachweis der gebundenen Sekundärantikörper erfolgte nach Waschschriffen mit TBSTT durch Chemilumineszenz mit Hilfe des ECL (Enhanced Chemiluminescence) Plus Western Blotting Detection Reagent (Amersham Biosciences) nach den Angaben des Herstellers, wobei das Signal mit einem lichtempfindlichen Film (Hyperfilm, Amersham Biosciences) detektiert wurde.

Die in den Western-Blot Experimenten verwendeten Antikörper wurden in den Legenden der Abbildungen im Ergebnisteil angegeben.

2.2.13.1 Phospho-p44/42 Nachweis mittels Western Blot

p44 und p42 MAP-Kinasen (auch extrazellulär regulierte Kinasen ERK1 und ERK2) gehören zu einer Protein-Kinase-Kaskade, die an der Regulation von Zellwachstum und Differenzierung beteiligt ist. MAP-Kinasen werden durch eine Vielzahl extrazellulärer Signale über eine Phosphorylierung von Threonin und Tyrosin (AS 202 und 204) aktiviert, die wiederum durch die vorgeschaltete MAP-Kinase-Kinase (MEK) ausgelöst wird (Cowley et al. 1994). Diese Aktivierung in Form der Phosphorylierung kann mittels monoklonaler Antikörper (mAk), die spezifisch die phosphorylierte Form erkennen, untersucht werden.

Dafür wurden HEK293 fLRAGE und HEK293 wt circa 40 h in DMEM/ 0,2 % FKS (v/v) kultiviert, um zunächst den Basallevel der Phosphorylierung zu reduzieren. 3 cm Zellkulturschalen wurden währenddessen mit 2 µg/ ml gereinigter mAk 9A11 oder 4F1 in PBS (siehe 2.3.6), sowie einer kommerziell erhältlichen IgG1 Isotyp-Kontrolle (Pharmingen) über Nacht bei 4°C beschichtet. 7×10^5 Zellen wurden pro Schale in Serum-freiem Medium ausplattiert und für 0 min (unstimuliert), 30 min, bzw. 2 h in den beschichteten Schalen inkubiert. Zusätzlich wurden Zellen für 15 min mit 30 mM H₂O₂ stimuliert, was als Positiv-Kontrolle zum Nachweis der Phosphorylierung diente. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers durch Abkratzen geerntet, abzentrifugiert und das Sediment in 40 µl eiskaltem PBS/ 2mM NaV resuspendiert, bevor 5 x Lämmli-Puffer zugefügt wurde.

Die so behandelten Proben wurden auf 12 % SDS Gele aufgetragen und anschließend auf PVDF-Membranen geblottet. Die Untersuchung der Proben erfolgte anschließend mit dem mAk #9106 (Cell Signaling; Beverly, MA, USA) durch exakte Befolgung des Detektionsprotokolls des Herstellers.

2.2.14 Metallchelate-Chromatographie

Für die Reinigung des sRAGE aus Zellkulturüberstand der transfizierten HEK293 Zellen (siehe 2.3.4), wurde der durch molekularbiologische Methoden am C-Terminus angebrachte His₆ Tag genutzt. Dieser Tag ermöglicht die Reinigung des Expressionsproduktes mittels Nickel-Nitrilo-Triessigsäure-Agarose (Ni-NTA; Qiagen, Hilden) als Affinitätsmatrix. Um den Gehalt an Fremdprotein so niedrig wie möglich zu halten, wurden die Zellen durch eine schrittweise Reduktion schließlich an 1,5 % FKS adaptiert, bevor der Überstand mit sezerniertem sRAGE für die Reinigung gesammelt wurde. 100 ml Zellkulturüberstand (Load, LD) wurden zu 100 µl Ni-NTA gegeben, die zuvor mit nicht-denaturierendem Metallchelate-Chromatographie-Puffer (MC-Puffer) äquilibriert wurde, und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopf-Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Ni-NTA durch Zentrifugation (2000 x g, 5 min, 4°C) sedimentiert, und der Überstand mit ungebundenen Proteinen wurde als Durchfluss (Flow Through, FT) bei 4°C gelagert. Die Nickelagarose wurde nun 3 x mit je 2 ml eiskaltem MC-Puffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu eliminieren. Auch die Waschfraktionen (W1 – W3) wurden für die nachfolgende Analyse aufgehoben. Anschließend wurde das sRAGE-Expressionsprodukt mit einem Imidazol-Gradienten eluiert, wobei das Imidazol mit dem rekombinanten Protein um die Metallionen kompetitiert. Es wurden fünf Elutionsschritten mit je 200 µl MC-Elutionspuffer mit schrittweise steigender Imidazol-Konzentration (50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM) durchgeführt. Zwischen den Wasch- und Elutionsschritten wurde die Agarose jeweils wie oben sedimentiert. Die eluierten Proben wurden gegen PBS dialysiert, um Imidazol zu eliminieren, das in folgenden Versuchen stören könnte.

Der Proteingehalt der verschiedenen Fraktionen wurde nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) mit dem kommerziell erhältlichen Bradford-Reagenz (BioRad) photometrisch bestimmt. Die Erstellung einer Eichgeraden mit einer BSA-Lösung (1 mg/ ml) ermöglichte die direkte Berechnung der Proteinkonzentration.

Mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung wurde die Reinheit des aus dem Zellkulturüberstand isolierten sRAGE untersucht.

Für die Aufreinigung großer Mengen wurden Zellkulturüberstände von bis zu 1 l mit Hilfe eines automatisierten Chromatographie-Verfahrens, der „fast protein liquid chromatography“ (FPLC), verarbeitet. Hierfür wurde das Gerät Äkta Prime (Amersham) verwendet. Das System besteht aus dem Pumpenmodul, einem UV Detektor (280 nm) und einem Fraktionskollektor. Für die Reinigung des Proteins über den His₆-Tag wurde eine mit Nickelsulfat (20 mM NiSO₄) beladene Säule (HiTrap Chelating HP, 5 ml; Amersham) angeschlossen. Das System wurde mit MC-Puffer äquilibriert, bevor der Zellkulturüberstand beladen wurde. Die Elution des sRAGE erfolgte durch eine Step-Elution mit 200 mM Imidazol. Die Elutionsfraktionen wurden gesammelt und wie oben weiterbehandelt.

2.2.15 ELISA

Die Methode des „enzyme linked immunosorbent assay“ (ELISA) wurde in verschiedenen Varianten für unterschiedliche Analysen verwandt. Zum einen wurden Mausseren und Hybridomzellkulturüberstände hinsichtlich der Antikörperproduktion untersucht, des Weiteren wurde die Bindung definierter AGE-Proben, bzw. des Liganden S100B an sRAGE getestet und schließlich wurde ein kommerziell erhältliches ELISA Kit eingesetzt, um die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB in Zellen nachzuweisen.

2.2.15.1 ELISA-Antikörper-Screening

Gereinigter sRAGE wurde in einer Konzentration von 5 µg/ ml in Beschichtungspuffer verdünnt. Je 100 µl wurden pro Vertiefung von 96-well Mikrotiterplatten aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nicht adsorbiertes Protein wurde durch vier Waschschriffe in einem Mikrotiterplatten-Waschgerät (Wellwash 4; Denley Instruments, Sussex, England) (200 µl ELISA-Waschpuffer/ Vertiefung) entfernt. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 200 µl PBS/ 5 % Milchpulver für 1h bei 37°C blockiert. Die Waschschriffe wurden wiederholt, dann erfolgte die Inkubation mit geeigneten Serumverdünnungen (1:10 bis 1:5000) oder unverdünntem Hybridomüberstand (je 100 µl/ well) für 1 h bei 37°C und danach wieder vier Waschschriffe. Anschließend wurde die Inkubation mit Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin konjugiert mit HRP (1:1000 in PBS, 100 µl/ well; DAKO,

Glostrup, Dänemark) für 1 h bei 37°C durchgeführt. Während der Waschschritte nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Substratlösung mit einer TMB-Tablette nach der Vorschrift der Firma Sigma hergestellt. Daraufhin wurden 100 µl/well auf die Platte aufgetragen und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Enzymreaktion wurde mit 50 µl/well 0,5 M H₂SO₄ abgestoppt, dann erfolgte die Messung des Farbumschlags, der mit der Menge an gebundenem Antikörper korreliert, am Plattenphotometer (Milenia Kinetic Analyzer) bei 450 nm und der Referenzwellenlänge 650 nm.

2.2.15.2 Untersuchung der sRAGE-Liganden-Interaktion

sRAGE wurde wie oben beschrieben auf die Platte aufgetragen und anstelle der Seren oder Zellkulturüberstände erfolgte die Inkubation mit 100 µg/ml modifizierter BSA-Proben, die mit Hilfe des DIG-Protein Labeling Kits (Roche) nach dem Protokoll der Hersteller mit Digoxigenin (DIG) markiert wurden. Die Bindung der Proben an das immobilisierte sRAGE-Protein wurde durch die Inkubation mit einem hochspezifischen HRP-gekoppelten anti-DIG-Antikörper nachgewiesen. Die Enzymreaktion und Messung der Absorption erfolgte wie oben beschrieben. Beim Versuch, unspezifische Bindungen der BSA-Proben zu blockieren, wurden verschiedene Blockierungslösungen getestet: PBS/ 5 % Milchpulver (w/v); PBS/ 3 % BSA (w/v) sowie eine Kombination dieser beiden und die kommerziell erhältliche Blockierungslösung von Roche.

Für den Nachweis der S100B-Bindung an immobilisierten sRAGE wurde das Protokoll leicht modifiziert: sRAGE wurde in einer Konzentration von 0,5 µg/ml auf die Platte aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Blockierungslösung wurde PBS/ 3 % BSA für 2,5 h bei 37°C inkubiert. Verschiedene Konformationen des S100B (Dimer, Tetramer, Tetramer/Hexamer, Hexamer/Oktamer) wurden in einer Konzentration von 5 pmol/well in 100 µl/well in Calcium-Bindungspuffer für 2 h bei RT, oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgte die Bindung des anti-S100B-Antikörpers (1:1000 in PBS/ 1 % BSA (w/v), 0,1 % Tween 20 (w/v); 100 µl/well) für 2 h bei RT. Diese Bindung wurde wiederum durch einen anti-Kaninchen-HRP-konjugierten Antikörper (1: 5000 in PBS; 2 h bei RT) nachgewiesen. Weitere Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

2.2.15.3 Nachweis der NF κ B-Aktivierung mittels ELISA

Um die Aktivierung von Zellen nach der Inkubation mit modifizierten BSA-Proben zu untersuchen (100 μ g/ ml, 24 h bei 37°C) wurden Kernextrakte nach dem Protokoll des MercuryTM TransFactor Kits (Clontech, Palo Alto, CA, USA) hergestellt und in dem MercuryTM TransFactor NF κ B p50 Kit (Clontech K2058-1) eingesetzt. Alle benötigten Reagenzien waren in dem Kit enthalten oder wurden nach den Angaben des Herstellers hergestellt.

2.2.16 EMSA

Der „Electromobility shift assay“ (EMSA) bietet eine schnelle und einfache Methode, um DNA-bindende Proteine zu detektieren. Sie basiert auf der Beobachtung, dass Komplexe aus Protein und DNA in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel langsamer wandern als freie DNA-Fragmente oder Doppelstrang-Oligonukleotide. Der Nachweis dieses sogenannten „Gel Shifts“ und damit der Interaktion von Protein und DNA erfolgt durch die Inkubation des gereinigten Proteins, bzw. einer Kernextrakt-Präparation mit einem ³²P-markierten DNA-Fragment, das die mögliche Protein-Bindungsstelle enthält. Hier wurde die Aktivierung von Zellen nach Stimulation untersucht, wobei die Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B in den Zellkern nachgewiesen wurde. Die Durchführung des Versuchs erfolgte mit Unterstützung von Dr. T. Illmer (Medizinische Klinik, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus).

2.2.16.1 Stimulation der Zellen

HEK293 fl RA und HEK293 wt Zellen wurden 40 h in D-MEM/ 0,2 % FKS (v/v) inkubiert, um die Grundaktivierung der Zellen auf einem niedrigen Niveau zu halten, so dass nach Stimulation auch geringe Aktivierungen detektiert werden können. Die Stimulation erfolgte durch Inkubation mit 100 μ g/ ml modifizierten BSA-Proben und nicht-modifiziertem BSA als Kontrolle für 6 h bei 37°C. Als Positivkontrolle wurde TNF α (10 ng/ ml) eingesetzt, das einen potenten Aktivator des NF κ B darstellt.

2.2.16.2 Herstellung der Kernextrakte

Die Kernextrakte wurden nach einem modifizierten Protokoll von Andrews und Faller hergestellt (1991). Hierfür wurden circa 2×10^7 Zellen 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen, nicht-enzymatisch unter Verwendung eines Zellschabers geerntet und

durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 500 x g, 4°C). Das Pellet wurde in 400 µl eiskaltem EMSA-Puffer A resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 s mit einem Vortex-Gerät (MS1 Minishaker) resuspendiert und abzentrifugiert (30 s, 20000 x g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 100 µl eiskaltem EMSA-Puffer C aufgenommen und 20 min auf Eis inkubiert. Nach abschließender Zentrifugation (5 min, 20000 x g, 4°C) wurde der Überstand, der die Kernproteine enthält, abgenommen und sofort bei –80°C tiefgefroren.

2.2.16.3 Radioaktive Markierung der Oligos

4,5 µl des NFκB-Oligos (1,75 pmol/ µl) wurden auf Eis mit 30 µl H₂O, 5 µl T4 Polynukleotidkinase-Puffer 10x, 1,5 µl T4 Polynukleotidkinase (Promega) und 4 µl [γ-³²P] ATP (3000 Ci/ mMol; 10 mCi/ ml; Amersham) gemischt und anschließend 10 min bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl EDTA gestoppt, und nicht inkorporierte Nukleotide wurden über eine G-25-Säule (Amersham) entfernt.

2.2.16.4 Bindung der Kernextrakte und native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

10 µg Kernextrakt wurden in 25 µl NFκB-Bindungspuffer und 0,2 µg/ µl poly(dI/ dC) auf Eis inkubiert, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Nach 20 min wurde der Reaktion ca. 30000 – 50000 cpm markiertes Oligonukleotid (1 ng) hinzugefügt und die Inkubation bei RT für 15 min fortgesetzt. Nach Zugabe von 5 µl EMSA-Ladepuffer wurden die DNA-Proteinkomplexe von der freien DNA-Probe durch native Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt. Hierfür wurden 5 % native Polyacrylamidgele (5,0 ml 0,5 x TBE, 12,5 ml Acrylamid (40 %-ig), 3,1 ml Methylen-bis-Acrylamid (2 %-ig), 3,1 ml Glyzerin (85 %-ig), 1 ml APS (10 %-ig), 100 µl Temed, 75,75 ml H₂O ad 100 ml) in vertikale Gelvorrichtungen (BioRad) gegossen. Vor dem Probenauftrag wurden die Gele 30 min in 0,5 x TBE bei konstanten 200 V vorgelaufen. Nach dem Auftragen der Proben erfolgte die Elektrophorese bei 200 V für 1,5 bis 2,5 h bei RT. Anschließend wurde das Gel auf Whatman DE-81 Papier (Schleicher und Schüll, Dassel) überführt und unter Vakuum auf einem Geltrockner für 90 min getrocknet. Die Exposition der Filme (Hyperfilm, Amersham) erfolgte über Nacht bei –80°C in Anwesenheit strahlungsintensivierender Folien für 6-48 h.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Bestimmung der Zellzahl

Sedimentierte Zellen wurden in 1 ml Medium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und in einem definierten Verhältnis mit Trypanblau gemischt, um beim Zählen der Zellen in der Neubauer-Zählkammer tote Zellen ausschließen zu können. Die lebenden Zellen in mindestens zwei der Großquadrate wurden gezählt und die mittlere Zellzahl bestimmt. Um die Zellzahl/ ml zu bestimmen, wurde folgende Formel angewandt: mittlere Zellzahl x Verdünnungsfaktor x 10^4 .

2.3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren wurden die Zellen sedimentiert und in 1 ml eiskaltem FKS/ 10 % Dimethylsulfoxyd (DMSO) (v/v) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde sofort in gekühlte Kryokonservierungsgefäße (1,8 ml) überführt und diese in ein mit 2-Propanol gefülltes Einfriergefäß gegeben, das dann bei -80°C gelagert wurde. Durch die Lagerung in 2-Propanol wurde eine schonende Abkühlung von 1°C/ min gewährleistet. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen später in Stickstofftanks gelagert.

Um kryokonservierte Zellen in Kultur zu nehmen, wurden die Zellen in einem 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und vorsichtig in FKS aufgenommen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation sedimentiert, der DMSO-enhaltende Überstand wurde vollständig entfernt, bevor die Zellen in entsprechendem Kulturmedium resuspendiert und in Kultur genommen wurden.

2.3.3 Kultivierung und Passagieren von Zelllinien

Die Zelllinien HEK 293, HEK 293 T und P815 wurden in DMEM kultiviert. Die Kultivierung der Suspensionszelllinien Molt, Jurkat und THP-1 erfolgte in RPMI. Falls eine Zelllinie mit einem Expressionsvektor kodierend für einen Selektionsmarker transfiziert worden war, wurde dem Medium eine getestete Konzentration des entsprechenden Antibiotikums zugegeben, um das Wachstum von untransfizierten Zellen zu inhibieren. Die Kultivierung sämtlicher Zellen erfolgte in einem Brutschrank mit 5 % CO₂-Begasung bei 37°C.

Das Passagieren von Suspensionszellen erfolgte durch die Entnahme der Zellsuspension aus dem Kulturgefäß, Sedimentierung durch Zentrifugation und Weiterkultivierung eines bestimmten Anteils (1/ 5 bis 1/ 10) der Zellen.

Die adhärennten Zelllinien wurden bei Erreichen von 80-90 % Konfluenz durch Inkubation mit PBS/ 1 mM EDTA (pH 8,0) bei RT von den Kulturgefäßen gelöst, sedimentiert und in Kulturmedium resuspendiert. Je nach Wachstumsverhalten wurde 1/ 3 bis 1/ 6 der Zellen in die Kulturgefäße für die Weiterkultivierung zurückgegeben.

2.3.4 Transfektion von adhärennten Zelllinien und Generierung stabiler Klone

Für die Transfektion wurde das Reagenz Lipofectamine 2000 (Invitrogen) eingesetzt, das sich die Bindung von kationischen Lipiden mit negativ geladenen DNA-Molekülen zu Nutzen macht. Der entstehende DNA-Lipid-Komplex kann über Endozytose oder Verschmelzung mit der Plasmamembran in die Zelle aufgenommen werden. Den Angaben des Herstellers wurde generell Folge geleistet, wobei die Zellen in Antibiotika-freiem Medium in 6-well Schalen ausplattiert wurden (6×10^5 / Vertiefung), so dass sie nach 24 h Inkubation 90 % Konfluenz erreichten. Für den Transfektionsansatz wurden pro Vertiefung 10 µl Lipofectamine 2000 in 250 µl serumfreiem Medium OptiMEM 1 (Invitrogen) verdünnt und in einem gesonderten Gefäß erfolgte die Verdünnung von 5 µg Vektor-DNA ebenfalls in 250 µl OptiMEM 1. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurden die beiden Ansätze vereint und für weitere 20 min bei RT inkubiert, bevor die Lipid-DNA-Komplexe tropfenweise zu den Zellen gegeben wurden. Nach einer Inkubationszeit von 8 h wurden die Zellen mit frischem Medium versorgt. Für die Generierung von stabilen Klonen wurde nach weiteren 40 h das entsprechende Antibiotikum zu dem Kulturmedium gegeben. Die benötigte Konzentration wurde in untransfizierten Zellen durch eine „Killing-Rate“ bestimmt, bei der die Konzentration ermittelt wird, die zum Absterben aller Zellen innerhalb von fünf Tagen führt. Nach ein bis zwei Wochen unter Selektionsdruck wurden die transfizierten Zellen so verdünnt, dass theoretisch eine Zelle in 100 µl Kulturmedium (mit Antibiotikum) enthalten war und diese verdünnte Zellsuspension wurde in 96-well-Platten eingesät (100 µl/ Vertiefung). Nur Einzel-Zellklone wurden expandiert und die Expression des Zielgens wurde analysiert.

Für die Transfektion von HEK293 Zellen wurden folgende Vektoren eingesetzt: pflRAGE-IRES2-EGFP und pcDNA3.1-flRAGE, die beide *flRAGE* als Zielgen enthalten und ein Resistenzgen, das für das Enzym Aminoglycosidphosphotransferase 3'(II) kodiert und Resistenz gegen das Antibiotikum Geneticin (G418 Sulfat) vermittelt; pSecTag2B-sRAGE, der die Expression des sRAGE-Proteins in den Zellen bewirkt und zusätzlich Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin vermittelt. Bei allen drei Vektoren steht das Zielgen unter der Kontrolle des Cytomegalie-Virus-Promotors. Zusätzlich zu den Zielgen-enthaltenden Vektoren wurden auch „mock“-Vektoren transfiziert, die zwar die Antibiotikaresistenz vermitteln, denen aber das Zielgen fehlt. Die so transfizierten Zellen dienten in Untersuchungen als Negativ-Kontrollen.

2.3.5 Transduktion von humanen Zelllinien

Für den stabilen Transfer von Vektor-DNA in Suspensionszellen wurde eine Transduktion mit Hilfe des Drei-Vektor-Systems nach Soneoka *et al.* (1995) durchgeführt, das auf dem „Molony murine leukaemia virus“ (MoMuLV)-abgeleiteten retroviralen Vektor pcz-CFG5.1-MCS basiert (Temme *et al.* 2003). Hierfür wurde die komplette Sequenz, die für flRAGE-IRES2EGFP kodiert mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Nhe* I (5') und *Hpa* I (3') aus dem vorher konstruierten Vektor pflRAGE-IRES2-EGFP herausgeschnitten und die 5'-überhängende Sequenz wurde durch eine Klenow-Auffüllreaktion (Klenow-Enzym, USB, Cleveland, Ohio, USA) mit stumpfen Enden versehen („blunt end“). Der Vektor pcz-CFG5.1-MCS wurde nur mit dem Enzym *Hpa* I behandelt, das stumpfe Enden erzeugt und anschließend einer Phosphatase-Behandlung (Alkalische Phosphatase aus fötalem Kalb, Promega, Madison, WI, USA) unterzogen, um die Religation des Vektors zu verhindern. Die Ligation des Inserts flRAGE-IRES2-EGFP in den Vektor pcz-CFG5.1-MCS erfolgte mit Hilfe des Fast-Link-Ligase Kits (Epicentre) nach dem „Blunt-End-Ligations“-Protokoll, wobei das Konstrukt pcz-CFG5.1- flRAGE-IRES2-EGFP entstand (Vektorkarte: siehe Anhang). Dem Zielgen ist in diesem Vektor das Verpackungssignal ψ (Psi) vorgeschaltet, das die Aufnahme der kodierenden Sequenz in Form von viraler RNA in Viruspartikel vermittelt. Dieser Vektor wurde zunächst für die transiente Transfektion von HEK293T Zellen, die als Verpackungszellen der Viruspartikel dienen, zusammen mit den Vektoren pHIT60 (Soneoka *et al.* 1995), der die Gene *gag* und *pol* enthält und pcz-VSV-Gwt

(freundliche Bereitstellung von D. Trono, Universität von Genf), der für das Hüllprotein der viralen Partikel kodiert, unter Verwendung des CalPhos Transfection Kit (BD Clontech), eingesetzt. Von jeder Plasmid-DNA wurden 10 µg für die Transfektion von 4×10^6 Zellen in einer 100 mm Schale verwendet. 8–12 h nach der Transfektion wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt, das mit 10 mM Natriumbutyrat versetzt war, was eine verstärkte Expression von Genen unter der Kontrolle des CMV-Promotors bewirkt. Nach weiteren 8 h Stunden Inkubation wurde das Medium erneut durch frisches Medium ohne Natriumbutyrat ersetzt. Am nächsten Tag wurden die Zielzellen, Molt, Jurkat und THP-1, mit einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen pro Vertiefung von 6-well-Schalen ausplattiert. 48 h und 72 h nach der Transfektion wurden die Überstände der Viruspartikel-produzierenden HEK293 T Zellen gesammelt und filtriert (45 µm Porengröße) und mit 8 µg/ ml Polybren (Hexadimethrinbromid) versetzt, bevor je 2 ml zu einer Vertiefung mit Zielzellen gegeben wurden. Es folgte eine Zentrifugation der Kulturplatten (2 h, 2400 x g, 30°C) und eine Inkubation von 24 h, nach der die Prozedur wiederholt wurde. Neben dem Vektor, der für die fIRAGE-Sequenz kodiert, wurde auch hier der gleiche Vektor ohne Zielgen, aber der IRES2-EGFP Sequenz als „mock“ Vektor mitgeführt. Durch die bicistronische Expression des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) konnte die Transduktionseffizienz direkt mikroskopisch oder durch FACS (fluorescence activated cell sorting) (siehe 2.3.7)-Analysen ermittelt werden.

2.3.6 Generierung monoklonaler Antikörper

Für die Generierung monoklonaler Antikörper wurden entsprechend der Hybridomtechnik (Köhler and Milstein 1975) Antikörper-produzierende Maus-Milzzellen, die nach der Immunisierung entnommen wurden, mit Maus-Myelomzellen der Linie X63Ag8.653 unter Benutzung von Polyethylenglycol (PEG) fusioniert.

Unter der Mithilfe von Frau H. Gebauer und Frau C. Gräfe (Institut für Immunologie, TU Dresden) wurden Mäuse des Stammes C3H x Balb/c F1 mit gereinigtem Protein-Antigen durch intraperitoneale Injektion immunisiert. Es wurden fünf Immunisierungen im Abstand von vier Wochen durchgeführt, wobei für die erste Immunisierung (Priming) 100 µg in komplettem Freundschens Adjuvans, für die folgenden Auffrischungs-Immunisierungen (Boost) 50 µg des gereinigten Proteins in inkomplettem Freundschens Adjuvans eingesetzt wurden.

Für das Screening wurde der Überstand der Hybridomzell-Klone auf seine Reaktivität für das zur Immunisierung eingesetzte Protein in ELISA, bzw. für membranständiges Protein auf HEK293-Transfektanten in FACS-Analysen getestet. Klone, die sowohl rekombinant hergestelltes Protein, also auch nativ exprimiertes Protein erkannten, wurden rekloniert und nach erneutem Testen expandiert.

2.3.7 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Expression des GFP in Zellen aber auch die Expression von Oberflächenmolekülen, wie fIRAGE unter Verwendung von spezifischen Primärantikörpern und Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern, wurde unter anderem mittels FACS untersucht. Die Färbung der Zellen (1×10^5 Zellen/ Analyse) erfolgte ohne Fixierung in 96-well-Spitzbodenplatten zunächst durch Inkubation für 20 min auf Eis mit dem Primärantikörper, wobei für den Nachweis von fIRAGE unverdünnte anti-RAGE-Hybridomüberstände (9A11, 4F1 oder 9G7) verwendet wurden. Als Kontrolle wurden unspezifische Antikörper des gleichen Isotyps eingesetzt. Nach einem Waschschrift mit eiskaltem PBS erfolgte die Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper ebenfalls für 20 min auf Eis im Dunkeln. Es wurden Antikörper mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Indocarbocyanin (Cy3) verwendet. Nach einem Waschschrift mit eiskaltem PBS wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und an dem FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert.

Bei der FACS-Analyse werden die Zellen über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette eingeführt. Durch hydrodynamische Fokussierung verengt sich der Probenstrom auf das Zentrum der Küvette, wobei gewährleistet wird, dass die Zellen einzeln den Messpunkt passieren, an dem ein fokussierter Laserstrahl auf die Zellen trifft, wobei die Zelle aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften das Licht streut. Somit kann man Größe (forward scatter, FCS) und Granularität (side scatter, FSC) unterschiedlicher Zellen unterscheiden. Gleichzeitig wird das durch die gebundenen, Fluoreszenz-markierten Antikörper emittierte Licht gemessen, wobei die Expressionsstärke des zu untersuchenden Proteins mit der Fluoreszenzintensität korreliert. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit Hilfe der WinMDI Software.

2.3.7.1 Zellbindungsassay

HEK293 fIRAGE und HEK293 wt wurden mit PBS/ 1mM EDTA abgelöst und mit eiskaltem PBS gewaschen. Je 5×10^5 Zellen wurden für 15 min auf Eis mit 200 µg/ml der DIG-markierten Proben inkubiert, anschließend folgte die Detektion der gebundenen Proben mit einem FITC-markierten anti-DIG Antikörper, der für 20 min auf Eis inkubiert wurde. Zwischen den einzelnen Schritten wurden jeweils zwei Waschschrirte mit eiskaltem PBS durchgeführt. Schließlich wurden die Zellen in PBS aufgenommen und mittels FACS analysiert.

2.3.8 Isolation und Kultivierung von Primärzellen

2.3.8.1 Isolation von HUVEC

Aus Nabelschnurblut isolierte Endothelzellen wurden dankenswerterweise von dem Institut für Physiologie der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden zur Verfügung gestellt. Hierfür wurden nach dem Protokoll von Schnittler *et al.* (1990) die Nabelschnüre gewaschen und für 5 min mit Kollagenase (0,05 %; Sigma) bei 37°C inkubiert. Isolierte Zellen wurden zweimal in M199 (GibcoBRL) gewaschen und anschließend in M 199, das mit 20 % Humanserum von gesunden Spendern, sowie Penicillin G (25 U/ ml) und Streptomycinsulfat (25 µg/ ml) versetzt war, in Kultur genommen. Für die Untersuchungen wurden Zellen der 2. Passage nach Erreichen von Konfluenz verwendet.

2.3.8.2 Isolation von peripheren Blutmonozyten über Plastikadherenz

Für die Gewinnung von Monozyten wurden zunächst periphere mononukleäre Zellen (PBMC) aus Vollblut über eine Dichtegradientenzentrifugation unter Einsatz einer Ficoll-Trennlösung isoliert (980 x g, 20 min, RT, ohne Bremse). Dabei werden aufgrund unterschiedlicher Dichteigenschaften Lymphozyten und Monozyten von den Erythrozyten und Granulozyten getrennt. Nach mehreren Waschschrirten in PBS wurden die Lymphozyten und Monozyten in RPMI aufgenommen und 3×10^6 Zellen wurden in die Vertiefungen von 6-well Kulturschalen ausplattiert. Nach 2 h Inkubation bei 37°C adhärirten die Monozyten an der Plastikoberfläche der Kulturschalen, während die Lymphozyten in Suspension verblieben. Durch vorsichtiges Waschen konnten die Lymphozyten entfernt werden, so dass eine reine Monozyten-Population erhalten wurde.

2.3.8.3 hAEpC Kultur

Das in der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Experimenten verwendete humane Lungengewebe sowie daraus isolierte Alveolarepithelzellen (hAEpC) wurden freundlicherweise von Dr. Carsten Ehrhardt (Abteilung für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie, Universität des Saarlands, Saarbrücken; jetzt: School of Pharmacy, University of Dublin, Trinity College, Dublin, Irland) bereitgestellt. Das Verfahren der Isolation der hAEpC soll hier nur kurz erläutert werden: primäre Alveolarepithel Typ II Zellen (AT II) wurden aus humanen Lungennormalgewebe, das bei Patienten mit Lungenresektion anfiel, isoliert. Die Gewinnung der Zellen erfolgte mit kleinen Änderungen nach einem Protokoll von Elbert *et al.* (1999). Das homogenisierte Gewebe wurde mit einer Kombination aus 150 mg Trypsin Typ I (Sigma) und 0,641 g Elastase (Cell Systems, St. Katharinen) in 30 ml BSF für 40 min bei 37°C enzymatisch verdaut. Die AT II Population wurde über mehrere Schritte mittels unterschiedlicher Zellanheftung, Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation und magnetischem Zell - „Sorting“ (HEA MicroBeads, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) gereinigt. Die isolierten Zellen wurden in einer Dichte von 6×10^5 Zellen/ cm^2 auf Kollagen-/ Fibronectin-beschichtete Polyester Filtereinsätze (Transwell Clear, Durchmesser: 6,5 mm, Porengröße: 0,4 μm ; Corning, Bodenheim) in SAGM Medium ausgesät und bei 37°C kultiviert. Für die KGF-Studien wurden die Zellen in Anwesenheit von 10 ng/ ml Keratinozyten Wachstumsfaktor (KGF; MoBiTec, Göttingen) über einen Zeitraum von acht Tagen kultiviert.

2.3.9 RAGE - Lokalisationsstudien

2.3.9.1 Gefrierschnitte und „HOPE“ – fixierte Schnitte von humanem Lungengewebe

Am Institut für Anatomie der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der TU Dresden wurden Doppelimmunfluoreszenz Färbungen von humanen Lungengefrierschnitten, die dankenswerterweise von Prof. Kasper bereitgestellt wurden, durchgeführt. Die Schnitte wurden in PBS gewaschen und mit polyklonalem Kaninchen-Antiserum gegen Surfactant-Protein C (SP-C; 1: 100 in PBS; Chemicon, Harrow, England), gegen Podocalyxin (Antiserum 0601; 1: 500 in PBS; großzügige Gabe von Dr. M.G. Farquhar, San Diego, CA, USA) oder mit einem polyklonalen anti-Pan-Keratin-Antikörper (1:100; Dako) inkubiert. Danach folgte die Färbung mit einem Texas-Red-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen Sekundärantikörper (1: 80; Dianova,

Hamburg). Die so behandelten Schnitte wurden anschließend mit dem unverdünnten anti-RAGE-Hybridomüberstand des Klons 9A11, gefolgt von einem FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörper (1: 80; Dianova) gefärbt. Für Negativ-Kontrollen wurden die Primärantikörper durch entsprechende Isotyp-Kontrollen ersetzt.

„HOPE“ – fixierte Lungenschnitte (freundliche Bereitstellung von Dr. T. Goldmann, Borstel; (Goldmann et al. 2003)) wurden mit dem biotinylierten Lektin *Lycopersicon esculentum* Agglutinin (LEA; 1: 800; (Bankston et al. 1991)) und anschließend Texas-Red-markiertem Avidin (1: 200; Vector Laboratories, Burlingham, CA, USA) behandelt. In Kontrollexperimenten wurde die Bindung des Lektins durch Vorinkubation mit einer 0,2 M Lösung des entsprechenden Zuckers inhibiert (Kasper et al. 1998). Für Doppelfärbungen wurde wie oben beschrieben der mAk 9A11 eingesetzt. Alle Waschschrte erfolgten in PBS. Als Eindeckmedium wurde PBS-Glycerol (1: 9), das mit 2,5 % (v/v) DABCO (Janssen, Beerse, Belgien) versetzt war, verwendet.

Die „HOPE“-fixierten Lungenschnitte wurden auch für Immunperoxidase-Färbungen eingesetzt, wobei der mAk 9A11 zusammen mit dem VECTASTAIN ABC System (Vector Laboratories) unter Befolgung des Herstellerprotokolls zum Einsatz kamen.

2.3.9.2 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie der hAEPc

Die verwendeten Antikörper (mAK anti-SP-D (Chemicon), mAK anti-Caveolin-1 (BD-Biosciences); polyklonaler Kaninchen-anti-AQP-5 (großzügige Gabe von Dr. S.E: Gabriel, University of North Carolina bei Chapel Hill, NC, USA) wurden jeweils 1: 100 in PBS/ 1 % (w/v) BSA verdünnt. Der mAk 9A11 wurde als unverdünnter Hybridomüberstand eingesetzt. Maus-IgG1 (MOPC-21, Sigma) diente als Isotyp-Kontrolle. Die auf Filtereinsätzen kultivierten AT II Zellen wurden an Tag 3, 6 und 8 nach Aussaat gefärbt. Hierfür wurden die Zellen für 10 min mit 2 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert, für weitere 10 min in 50 mM NH₄Cl blockiert und für 8 min mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. Die Inkubation der Zell-Monolayer mit den jeweiligen Primärantikörpern (je 100 µl) erfolgte für 60 min. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 100 µl einer 1: 100 Verdünnung der Sekundärantikörper (Alexa-Fluor 488-markiertes Ziege-anti-Maus, oder Ziege-anti-Kaninchen F(ab')₂ Fragment (Invitrogen) in PBS/ 1 % (w/v) BSA) inkubiert. Für die Gegenfärbung der Kerne wurde 1 µg/ ml Propidium-Iodid (PI) zugefügt. Nach 30 min

erfolgten drei Waschschr tte mit PBS, woraufhin die Zellen in FluorSave anti-fade Medium (Calbiochem, Bad Soden) eingebettet wurden. Die Vorbereitung der Zellen und die Aufnahmen wurden von Dr. C. Ehrhardt (siehe S. 46) an einem Konfokalen Laserscanning Mikroskop (MRC-1024, BioRad) durchgeführt.

2.3.9.3 Immunogold-Elektronenmikroskopie

Die Vorbehandlung der Zellen für die Immunogold-Elektronenmikroskopie sowie die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. M. Laue (Zentrum für Elektronenmikroskopie, Medizinische Fakultät, Universität des Saarlands, Homburg) durchgeführt. Die von ihm angewandte Methode wird kurz zusammengefasst:

Die auf Filtereinsätzen angewachsenen hAEPc wurden mit PBS gewaschen und für mehrere Stunden in Immunogold-Fixierung bei RT inkubiert und anschließend bei 4 C gelagert. Kleine Filterscheiben (3 mm Durchmesser) wurden ausgeschnitten und durch schrittweise Erniedrigung der Temperatur in Kombination mit einer steigenden Ethanolreihe dehydriert (30 %, 0 C; 50 %, -20 C; 70 %, 90 %, 100 %, -35 C für je 1 h). Es folgte die Infiltration von Lowicryl K4M (Polysciences, USA)  ber Nacht bei -35 C und die Polymerisation durch UV-Licht (FSU010 Apparatur, Balzers, FL), bevor die Temperatur an je einem Tag auf 0 C und RT erhöht wurde. Ultradünnschnitte wurden hergestellt und für die Immunmarkierung in je 30 Öl folgender Lösungen plaziert: 50 mM Glyzin in PBS; Immunogold-Blockierung; mAK 9A11 ( ber Nacht bei 4 C in feuchter Kammer); Immunogold-Blockierung; Ziege-anti-Maus-Antikörper, gekoppelt an 10 nm Kolloid-Gold (Aurion, NL); Immunogold-Blockierung; PBS; 2,5 % (w/v) Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer; PBS, H O. Die getrockneten Schnitte wurden anschließend mit einer Mischung aus Uranyl Acetat und Methylcellulose gefärbt (Roth et al. 1990) und mit einem Tecnai 12 Biotwin Transmissions Elektronenmikroskop (FEI Co., USA), das mit einer 1k-CCK-8 Kamera (Megaview III, Soft Imaging Systems) ausgerüstet war, analysiert.

2.3.10 Untersuchung der Adhärenz-Kinetik → CCK-8

Die Geschwindigkeit der Adhärenz von HEK293 fIRAGE und HEK293 wt Zellen an Kollagen IV-beschichtete Vertiefungen einer 96-well-Platte wurde mit Hilfe des Cell Counting Kits CCK-8 (Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz) unter Befolgung des von den Herstellern empfohlenen Protokolls analysiert und quantifiziert. 5×10^4 Zellen wurden in 100 Öl DMEM/ 10 % (v/v) FKS in die mit $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Kollagen IV - (BD

Biosciences) beschichteten Vertiefungen gegeben und bei 37°C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit je 100 µl PBS gewaschen, um nicht anhaftende Zellen zu entfernen. Es folgte die Inkubation mit Medium (100 µl/ well), das mit CCK-8 Reagenz versetzt war (10 µl CCK-8/ 100 µl Medium) für 2 h bei 37°C. Danach wurde die Zahl der adhärenen Zellen mittels Absorptionsmessung bei 450 nm an einem Mikrotiter-Platten-Reader (Milenia Kinetic Analyzer) durch Vergleich mit der resultierenden Absorption der Ausgangszellzahl (ohne Waschschrirte) quantifiziert. Für Blockierungsstudien wurden die HEK293 fRAGE Zellen mit anti-RAGE Reagenzien oder den entsprechenden Kontrollen (polyklonale Seren wurden 1:30 in 10 % FKS in Medium verdünnt, mAK wurden in einer Konzentration von 200 µg/ ml eingesetzt) für 20 min auf Eis vorinkubiert, bevor die Zellen für 13 min in den Kollagen IV beschichteten Vertiefungen inkubiert wurden. Die weiteren Schritte erfolgten wie oben. Es wurden jeweils Dreifach-Bestimmungen durchgeführt.

2.3.11 Untersuchung des „Spreading“-Verhaltens → DIC Mikroskopie

HEK293 fRAGE im Vergleich zu HEK293 mock und HEK293 wt Zellen wurden auf ihr „Spreading“-Verhalten auf unterschiedlichen Matrices untersucht. 7×10^4 Zellen wurden in DMEM auf 2-Kammer-Deckgläschen ausplattiert (Nalge Nunc, Naperville, IL, USA), die entweder mit humanem Kollagen IV ($1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), Laminin ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; BD Biosciences) oder Fibronektin ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$; Roche) beschichtet waren. Nach 3 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Zellen lebend durch Interferenz-Mikroskopie an einem Zeiss Axiovert 100M Mikroskop analysiert, das mit einer Hamamatsu Digitalkamera (C4742-95, Hamamatsu, USA) ausgerüstet war, mit freundlicher Unterstützung von Dr. L. Knels (Institut für Anatomie, Medizinische Fakultät C.G. Carus, TU Dresden, Dresden).

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung von sRAGE

Für die Untersuchung der Bindung definierter AGEs an RAGE wurde zunächst das lösliche RAGE (sRAGE) -Konstrukt generiert und rekombinant exprimiert (Abb. 5).

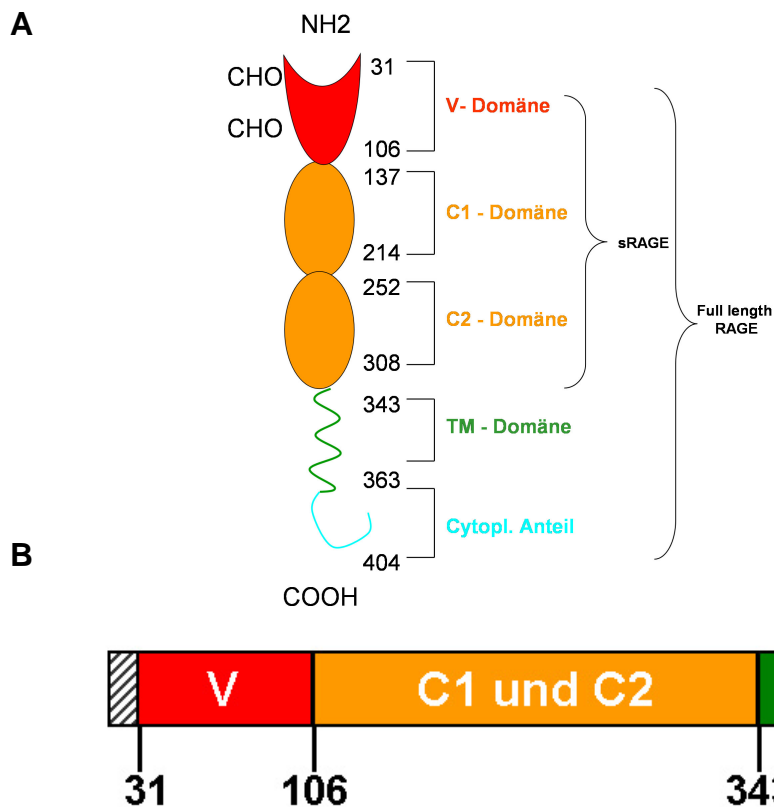


Abbildung 5. Schematische Darstellung von RAGE. (A) Angabe der in den hergestellten Konstrukten vorkommenden Domänen. (B) Dem sRAGE-Konstrukt wurde zusätzlich zu der extrazellulären Domäne über die Klonierungsstrategie C-terminal ein His₆-Tag angefügt, am N-Terminus befindet sich die aus dem Vektor pSecTag B stammende Signalsequenz der murinen Ig κ Kette.

sRAGE, der nur aus der extrazellulären Domäne des humanen Rezeptors besteht, wurde in der humanen Zelllinie HEK293 exprimiert. Durch die Verwendung des Vektors pSecTag2B (Invitrogen, siehe Material und Methoden 2.2.5.1) wurde erreicht, dass das Protein in den Zellkulturüberstand sezerniert wurde, so dass eine einfache Aufreinigung direkt aus dem Überstand, ohne Zellaufschluss, durchgeführt werden konnte. Hierfür wurde in dem löslichen Rezeptor C-terminal ein His₆-Tag eingeführt, der die Aufreinigung mittels Metallchelatchromatographie ermöglichte.

Diese Methode wurde zunächst im „Batch-Verfahren“ mittels Nickel-Agarose etabliert und schließlich für die Gewinnung großer Proteinmengen mit dem automatisierten Verfahren der FPLC unter Verwendung des Äkta Prime Geräts durchgeführt. Die Reinheit des so gewonnenen sRAGE-Proteins wurde durch SDS PAGE und anschließende Commassie Färbung ermittelt (Abb. 6A und B).

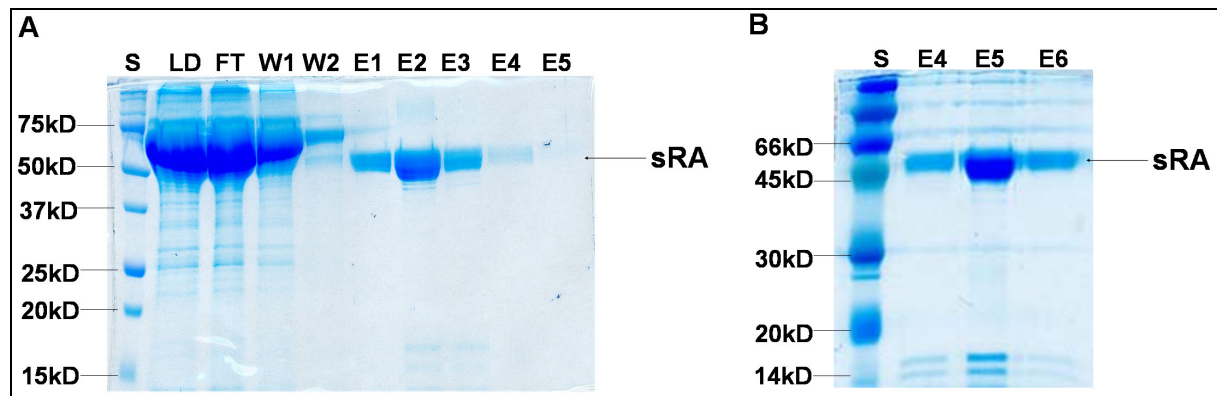


Abbildung 6. Coomassie-Färbung von SDS-Gelen nach affinitätschromatographischer Reinigung des sRAGE aus dem Zellkulturüberstand stabil transfizierter HEK293 Zellen. (A) Reinigung mittels Nickel-NTA-Agarose im Batch-Verfahren. (B) Reinigung mittels FPLC unter Verwendung von HighTrap Chelating Säulen, die mit Nickelsulfat beladen wurden. S: MW-Standard; LD: „Load“ (Überstand vor der Reinigung); FT: „Flow through“ (Durchfluss) mit ungebundenen Proteinen; W: Waschfraktionen; E: Elutionsfraktionen

In den Elutionsfraktionen beider Reinigungsverfahren tritt eine prominente Bande bei ~45 kD auf, was dem Molekulargewicht des sRAGE entspricht. Abbildung 6B zeigt zusätzlich zu der starken Bande bei 45 kD schwächere Banden zwischen 14 und 20 kD, die vermutlich auf Abbauprodukte durch Proteaseaktivität zurückzuführen sind, da das Äkta Prime-Verfahren aus technischen Gründen bei RT durchgeführt wurde. Weiterer enzymatischer Abbau des gereinigten Proteins wurde durch die Zugabe von Protease-Inhibitoren zu den Elutionsfraktionen verhindert. Für die folgende Immunisierung (siehe 3.2) mit dem gereinigten sRAGE waren Abbauprodukte unerheblich, da die Spezifität der gewonnenen Antikörper durch die komplexen Screening-Verfahren gewährleistet wurde. Um die Funktionalität des sRAGE garantieren zu können, wurden weitere Untersuchungen zur Charakterisierung unternommen, wie zum Beispiel die Analyse des Vorhandenseins von N-verknüpften Glykosilierungen. Die Peptid: N-Glykosidase F (PNGase F) hydrolysiert durch die sehr breite Substratspezifität nahezu alle N-glykosidischen Bindungen (Tarentino and Plummer 1987). Diese Eigenschaft war von Vorteil, da die genauen N-verknüpften

Glykosilierungen von RAGE noch nicht spezifiziert sind. Die Glykosidase-Behandlung des sRAGE führte zu einer Verringerung des Molekulargewichts, was darauf hinweist, dass die für die Ligandenbindung essentiellen posttranslationalen Modifikationen in Form von N-Glykosilierungen, die für die variable Domäne des RAGE beschrieben wurden (Srikrishna et al. 2002), vorhanden sind (Abb. 7). Das so hergestellte und in gereinigter Form vorliegende sRAGE-Protein stand nun für verschiedene Anwendungen zur Verfügung.

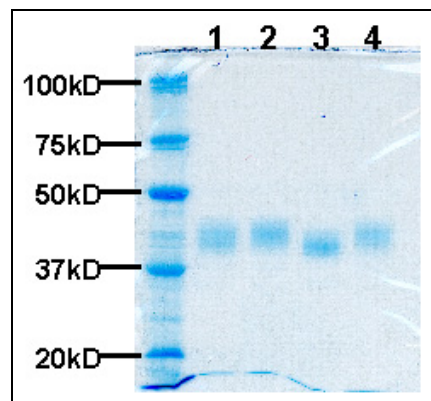


Abbildung 7. Deglykosylierung von sRAGE. Das 8 % SDS-Gel zeigt nach der Coomassie-Färbung die Reduktion des Molekulargewichts von sRAGE nach der Inkubation mit PNGase F (Spuren 1 und 3) im Gegensatz zu den Kontrollen (Spuren 2 und 4). Es wurden Inkubationsbedingungen mit SDS- (Spuren 1 und 2) oder ohne SDS-Zugabe im Puffer getestet (Spuren 3 und 4). SDS führt zur Denaturierung, was für die effiziente Deglykosylierung mancher Proteine notwendig ist. Da die Bedingungen der Deglykosylierung von sRAGE nicht bekannt waren, wurden sowohl denaturierende als auch nicht-denaturierende Bedingungen getestet.

3.2 Herstellung monoklonaler anti-RAGE-Antikörper

Da der bereits am Institut für Immunologie vorhandene monoklonale Antikörper (A11) natives, zellexprimiertes RAGE nur schwach erkannte, wurden neue monoklonale Antikörper generiert, indem der oben beschriebene, gereinigte sRAGE für die Immunisierung von Balb/c Mäusen eingesetzt wurde. Die Immunisierungen erfolgten wie unter 2.3.6 beschrieben. Vier Wochen nach der letzten Injektion wurde die Fusion der Milzzellen einer der immunisierten Mäuse mit immortalisierten B-Zellen durchgeführt. Die entstandenen Hybridomzellen wurden kloniert. In den ersten Screening-Runden wurden rund 800 Klone getestet und untersucht, ob sRAGE, gegen das immunisiert wurde, im ELISA erkannt wird. Bei weiteren Screening-Analysen wurden solche Klone der Hybridomzellen expandiert, die zusätzlich zu sRAGE, natives RAGE an der Zelloberfläche von Säugerzellen spezifisch erkannten.

Hierfür wurde das Gesamtlängen-RAGE Konstrukt (flRAGE) stabil in HEK293 Zellen exprimiert (siehe 2.2.5.2 und 3.3). Die Hybridomüberstände der drei am stärksten reagierenden Klone, mit den Bezeichnungen 9A11, 9G7 und 4F1, wurden gesammelt und entweder direkt eingesetzt, oder die Antikörper wurden aus dem Überstand gereinigt, um sie in konzentrierter Form einzusetzen. Bei allen drei Antikörpern handelt es sich um Antikörper mit dem Isotyp IgG1. Die gewonnenen Antikörper führten in FACS-Analysen zu einer erheblich stärkeren Färbung des nativen, membranständigen flRAGE in transfizierten HEK293 Zellen im Vergleich zu dem vorher generierten Antikörper A11 (Abb. 8). In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass 9A11, 9G7 und 4F1 auch im Western Blot eingesetzt werden können.

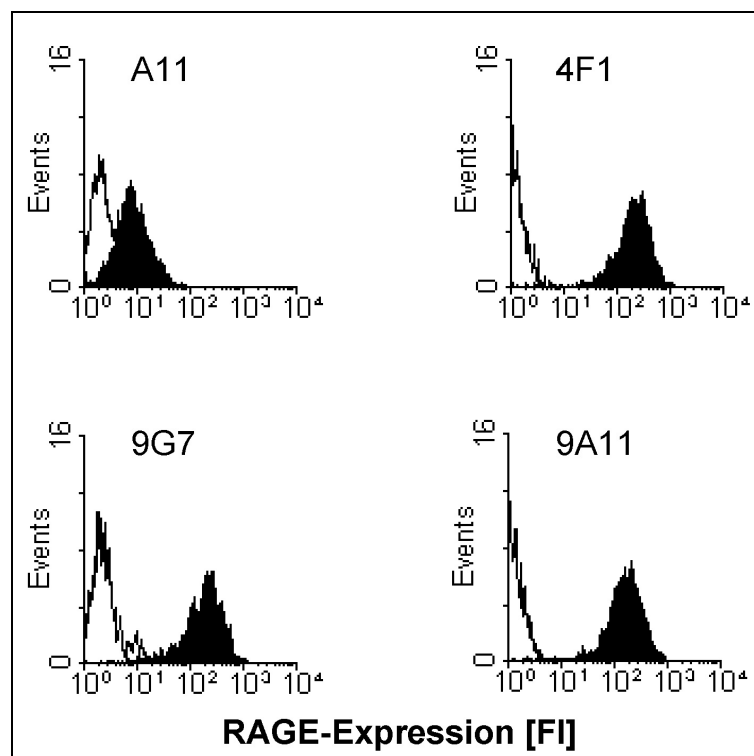


Abbildung 8. Vergleich der Bindungseffizienz verschiedener monoklonaler anti-RAGE-Antikörper. HEK293 flRAGE (schwarze Kurven) und HEK293 mock Zellen (weiße Kurven) als Kontrolle wurden mit unverdünnten Hybridomüberständen verschiedener Klone und anschließend mit dem FITC-markierten Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper (DAKO; 1:100) gefärbt. Die Bindung der Antikörper wurde mittels FACS analysiert. Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität (FI) in dem FL-1 Kanal (x-Achse).

3.3 Herstellung des fRAGE-Konstrukts

Neben sRAGE wurde die komplette humane Sequenz des membranständigen Rezeptors (fRAGE) ebenfalls in der Zelllinie HEK293 stabil exprimiert (Abb. 9A). Hierfür wurden zwei Expressionsvektoren verwendet, pIRES2EGFP (Clontech) und pcDNA3.1+ (Invitrogen) (siehe 2.2.5.2). Bei beiden Vektoren steht das Zielgen unter der Kontrolle des CMV-Promotors und beide vermitteln Geneticin-Resistenz. pIRES2EGFP weist die Besonderheit auf, dass zusätzlich zu dem Zielgen das „enhanced green fluorescence protein“ (EGFP) bi-cistronisch exprimiert wird und somit die Transfektionseffizienz mikroskopisch ermittelt werden kann. Der Nachweis der Oberflächenexpression des fRAGE erfolgte durch Verwendung der neu generierten monoklonalen anti-RAGE-Antikörper in FACS Analysen (vgl. Abb. 8) und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (Abb. 9B).

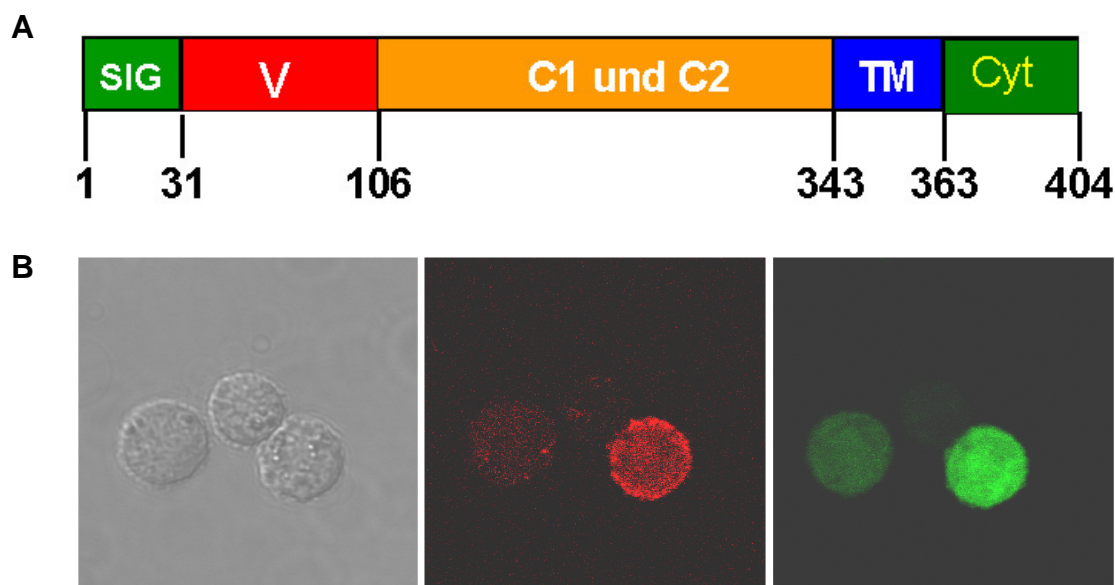


Abbildung 9. „Full length“ RAGE (fRAGE). (A) graphische Darstellung der Domänen des fRAGE-Konstrukts mit der homologen Signalsequenz (SIG), der variablen Domäne (V) gefolgt von den beiden konstanten Domänen (C1 und C2), dem Transmembranabschnitt TM und dem intrazytoplasmatischen Teil (Cyt). (B) RAGE-Oberflächenexpression in HEK293 Zellen nach transients Transfektion mit p fRAGE-IRES2-EGFP. Die Zellen wurden in Suspension mit dem mAk 9A11 (unverdünnter Hybridomüberstand) und einem Cy3-markierten Sekundärantikörper (Dianova, 1:100) gefärbt, auf Deckgläschen fixiert und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie analysiert. Der Vergleich der Durchlichtaufnahme (links) mit den Aufnahmen der Kanäle für rote (Mitte) bzw. grüne (rechts) Fluoreszenz zeigt, dass nur Zellen die RAGE an der Oberfläche exprimieren, was durch die typische Ringfluoreszenz demonstriert wird, auch EGFP positiv sind. Somit kann man bei Verwendung dieses Vektors durch Analyse der grünen Fluoreszenz indirekt auf die RAGE-Expression schließen.

3.4 AGE-Bindungsassay

Ursprünglich sollten die generierten RAGE-Proteine unter Anderem in Funktionsanalysen eingesetzt werden. Langfristiges Ziel dieser Studien war, im Rahmen eines Verbundprojekts einen Biosensor zur Messung nichtenzymatischer Glykierungsprodukte in Nahrungsmitteln und Blut zu entwickeln. Rekombinant hergestellter sRAGE sollte zu diesem Zweck auf anorganischen Trägern über polymere Dünnschichten immobilisiert werden. Die so gewonnenen RAGE-Membranen waren als Grundprinzip für die Messung von Glykierungsprodukten in den komplexen Matrices angedacht. Zur Beurteilung der Spezifität war geplant, bekannte Glykierungsprodukte als Referenzmaterialien herzustellen und sie hinsichtlich ihrer Affinität zu RAGE durch geeignete Festphasenbindungsassays zu prüfen. Zunächst wurde die Bindung verschiedener AGEs an gereinigtes sRAGE-Protein in ELISA-Studien untersucht. Hierbei sollte geklärt werden, welche Glykierungsprodukte von RAGE erkannt werden und wie spezifisch sie gebunden werden. Dies stellt die Voraussetzung für die Generierung des Polymer-immobilisierten RAGE dar, der als Messsonde für AGEs dienen sollte. Die AGE-modifizierten Proben wurden von dem Verbundprojektspartner Prof. Henle am Institut für Lebensmittelchemie der TU Dresden zur Verfügung gestellt. Sie wurden im Rahmen einer Diplomarbeit in diesem Institut von Alexander Sommer generiert. Die Herstellung der eingesetzten AGEs und deren Zusammensetzung wurden dort beschrieben (Sommer 2003). Bovines Serumalbumin (BSA) diente als Ausgangsprotein für die unterschiedlichen Modifizierungen. Die durchgeführten Modifikationen sind in Tabelle 4 aufgelistet und in Abbildung 10 teilweise graphisch dargestellt.

Bezeichnung	AGE	Bemerkung	Derivatisierung
BSA	-	Ausgangs-BSA (Fa. Sigma)	-
CML _{min} -BSA	N ^ε -Carboxymethyllysine (CML)	im Protein zugängliche Lysinreste anteilig carboxymethyliert	ca. 30 %
CML _{max} -BSA	N ^ε -Carboxymethyllysine (CML)	im Protein zugängliche Lysinreste praktisch vollständig carboxymethyliert	> 90 %
MG _{min} -BSA	v.a. Imidazolinon 2	im Protein zugängliche Argininreste anteilig derivatisiert	ca. 25 %
MG _{max} -BSA	v.a. Imidazolinon 2	im Protein zugängliche Argininreste praktisch vollständig derivatisiert	> 90 %

Tabelle 4: Hergestellte „AGE-BSA“ Proben für die Untersuchung der Bindung an RAGE.

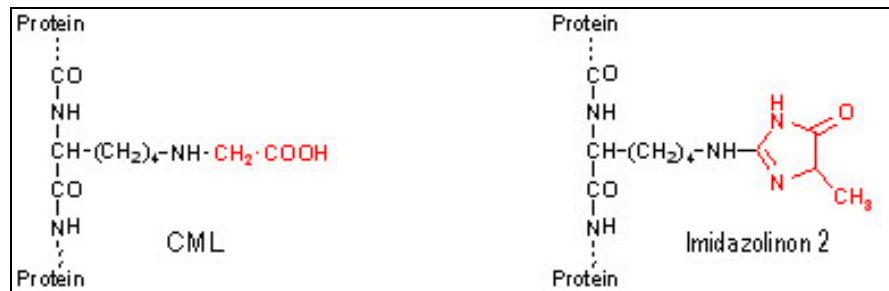


Abbildung 10. Aminosäuremodifikationen in BSA-Präparaten.

Für den Bindungsnachweis wurden zwei Varianten getestet: zum einen wurde sRAGE an der Plastikoberfläche von 96-well-Platten immobilisiert, und die AGEs sollten durch eine Digoxigenin-Markierung über einen hoch sensitiven anti-Digoxigenin-Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 11A). Bei diesem Versuch wurde keine spezifische Bindung der Proben an immobilisiertes sRAGE erreicht. Nicht-modifiziertes BSA, das als Kontrolle diente, wies eine ebenso starke Bindung an sRAGE wie AGE-BSA, CML_{min} oder MG_{min} auf. Lediglich CML_{max} interagierte fast doppelt so stark mit sRAGE im Vergleich zu den übrigen Proben. Allerdings zeigte sich bei dem dargestellten Versuch, dass diese Bindung unabhängig von RAGE war, da alle Proben stärker an die unbeschichteten, blockierten Vertiefungen banden, als an die mit sRAGE-beschichteten Vertiefungen. In einer zweiten Variante des Versuchsaufbaus sollte die Bindung von sRAGE an immobilisierte AGEs ermittelt werden. Dabei bestand der Vorteil darin, dass spezifische anti-RAGE-Antikörper genutzt werden konnten und man nicht auf eine Markierung der Proben angewiesen war. Auch bei diesem Ansatz konnte kein Nachweis einer spezifischen Interaktion der modifizierten BSA-Proben erbracht werden (nicht gezeigt).

Um eine Denaturierung des sRAGE oder der AGE-Proben durch die Immobilisierung an der Plastikoberfläche der Mikrotiterplatten auszuschließen, die zu der unspezifischen Bindung führen könnte, wurde eine weitere Methode zum Nachweis der AGE-RAGE Bindung getestet. sRAGE wurde über den C-terminal angefügten His₆-Tag an Nickelagarose gebunden. Als Kontrolle wurde die Agarose nicht mit sRAGE versehen, was den ungebundenen Vertiefungen in der ELISA-Untersuchung entsprach. Nach Blockierung freier Bindungsstellen der Nickel-Agarose mit FKS-haltigem Medium wurden die Ansätze mit den verschiedenen Digoxigenin-markierten AGE-Proben und wiederum nicht-modifiziertem BSA inkubiert. Ungebundene Proben

wurden durch intensives Waschen entfernt, bevor die gebundenen Proben mittels Imidazol eluiert und anschließend im Western Blot untersucht wurden (Abb. 11B).

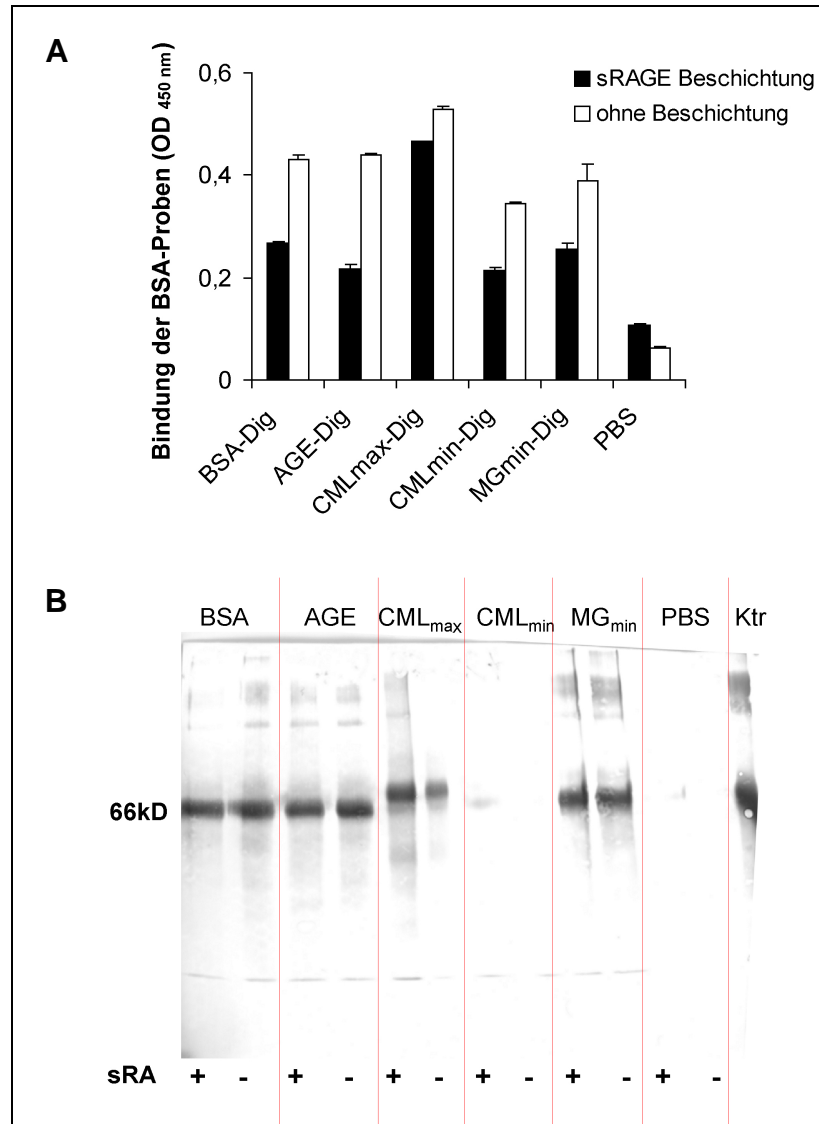


Abbildung 11. AGE-Bindung an sRAGE. (A) Immobilisierter sRAGE (1 µg/ well) wurde in einem ELISA auf seine Fähigkeit DIG-markierte AGE-modifizierte BSA-Proben (50 µg/ ml) zu binden, untersucht. Als Kontrolle dienten nicht-modifiziertes BSA und PBS, sowie unbeschichtete Vertiefungen. Der Nachweis der AGE-Bindung erfolgte durch einen anti-DIG-HRP-gekoppelten Antikörper (damals Boehringer; 1: 1000). Die Mittelwerte und mittlere Standardabweichung von jeweils drei Vertiefungen sind gezeigt. (B) sRAGE wurde über den His₆-Tag an Nickelagarose gebunden (0,5 mg/ ml Agarose). Freie Bindungsstellen wurden durch FKS-haltiges Medium blockiert, bevor die Inkubation mit den DIG-markierten, AGE-modifizierten BSA-Proben (50 µg/ 50 µl Agarose-Ansatz) erfolgte. Als Negativkontrolle dienten wiederum nicht-modifiziertes BSA sowie PBS, und nicht-beladene Nickelagarose. Gebundene Proben wurden eluiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung des anti-DIG-HRP-markierten Antikörpers (1:2500) analysiert. Die Bande bei 66 kD entspricht den modifizierten BSA-Proben. Als Positivkontrolle für das Nachweissystem wurde DIG-markiertes Protein direkt auf das Gel aufgetragen (Ktr).

Korrelierend mit den Ergebnissen der ELISA Untersuchungen fand bei diesem Verfahren keine spezifische Bindung an sRAGE statt. BSA, AGE und MG_{min} konnten unabhängig von der Anwesenheit von sRAGE von der Agarose eluiert werden. CML_{max} band stärker an die mit sRAGE versehene Agarose als an die ohne sRAGE inkubierte Agarose, wohingegen CML_{min} in beiden Ansätzen nicht gebunden hatte und damit nicht im Western Blot detektiert werden konnte.

3.5 Bindung von S100B an sRAGE

Die bisherigen Ergebnisse der AGE-Bindungs-Analysen riefen die Frage nach der Funktionalität des sRAGE-Proteins auf. Um mögliche Fehler im sRAGE-Konstrukt auszuschließen, wurde die Bindung eines weiteren beschriebenen Liganden, S100B (Hofmann et al. 1999), an sRAGE untersucht. Für den Nachweis wurde wiederum das ELISA-Format gewählt, wobei die Mikrotiterplatte mit sRAGE beschichtet wurde, und die Bindung des S100B an das so immobilisierte sRAGE über spezifische Antikörper gezeigt wurde (Abb. 12).

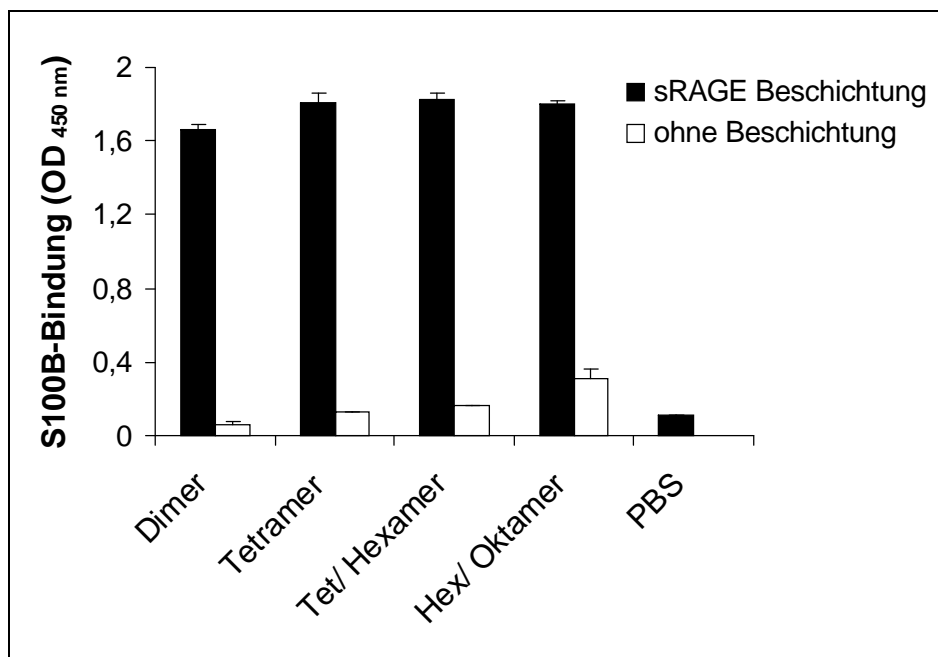


Abbildung 12. S100B-Bindung an sRAGE. Unterschiedliche Multimerkonformationen von S100B (5 pmol/ well) wurden mittels ELISA auf ihre Bindungsfähigkeit an immobilisiertes sRAGE (50 ng/ well) untersucht. Als Kontrollen dienten unbeschichtete Vertiefungen, sowie PBS anstelle des S100-Liganden. Der Nachweis der Bindung erfolgte durch einen polyklonalen Kaninchen-anti-S100-Antikörper (1: 1000) in Verbindung mit einem anti-Kaninchen-HRP-markierten Antikörper (Chemicon; 1: 7500). Die Mittelwerte und mittlere Standardabweichung von jeweils drei Vertiefungen sind gezeigt.

Als Kontrolle wurde der gleiche Ansatz ohne Beschichtung der Mikrotiterplatten mit sRAGE durchgeführt. S100 Moleküle treten meist als Dimere auf, jedoch werden auch Multimere nicht ausgeschlossen (Donato 2001). In diesem Ansatz wurde die Affinität des S100B Dimers, Tetramers, einer Mischung aus Tetramer und Hexamer, sowie einer Mischung aus Hexamer und Oktamer verglichen.

Die multimeren S100B Moleküle, ebenso wie der anti-S100B-Antikörper wurden großzügigerweise von Thorsten Ostendorp und Günter Fritz (Fachbereich für Biologie, Sektion Naturwissenschaften, Universität Konstanz) zur Verfügung gestellt. Für alle S100B Multimerformationen konnte eine hochspezifische und starke Bindung an sRAGE gezeigt werden. Es erfolgte nur eine sehr schwache Absorptionsmessung in Abwesenheit von sRAGE, die vergleichbar mit der Absorption der Kontrolle war, bei der nur der Sekundärantikörper ohne vorherige Ligandenbindung eingesetzt wurde, und somit die Hintergrund-Absorption darstellte. Das Ergebnis weist auf die Funktionalität des sRAGE hin und bestätigt die generelle Eignung für die Untersuchung der Ligandenbindung.

3.6 Zellbindungsassays mit DIG-markierten AGEs

Die bisherigen Versuche wurden mit gereinigtem sRAGE durchgeführt. Denkbar ist, dass das gereinigte Protein, das zwar mit S100B interagieren kann, nicht in der für die AGE-Bindung notwendigen Konformation vorliegt. Um dies zu untersuchen, wurden Bindungsstudien mit den HEK293 fIRAGE Zellen unternommen, die den Rezeptor stark an der Oberfläche exprimieren (vergleiche Abb.8).

Der Nachweis der Bindung der DIG-markierten BSA-Proben and HEK293 fIRAGE im Vergleich zu HEK293 wt erfolgte über einen anti-DIG-FITC-Antikörper mittels FACS (Abb. 13). BSA, AGE-BSA, CML_{min}-BSA und MG_{min}-BSA banden -unabhängig von der RAGE-Expression- nicht an die Zellen. Lediglich CML_{max}-BSA zeigte eine etwas stärkere Bindung an HEK293 fIRAGE als an HEK293 wt Zellen, die jedoch nicht signifikant war.

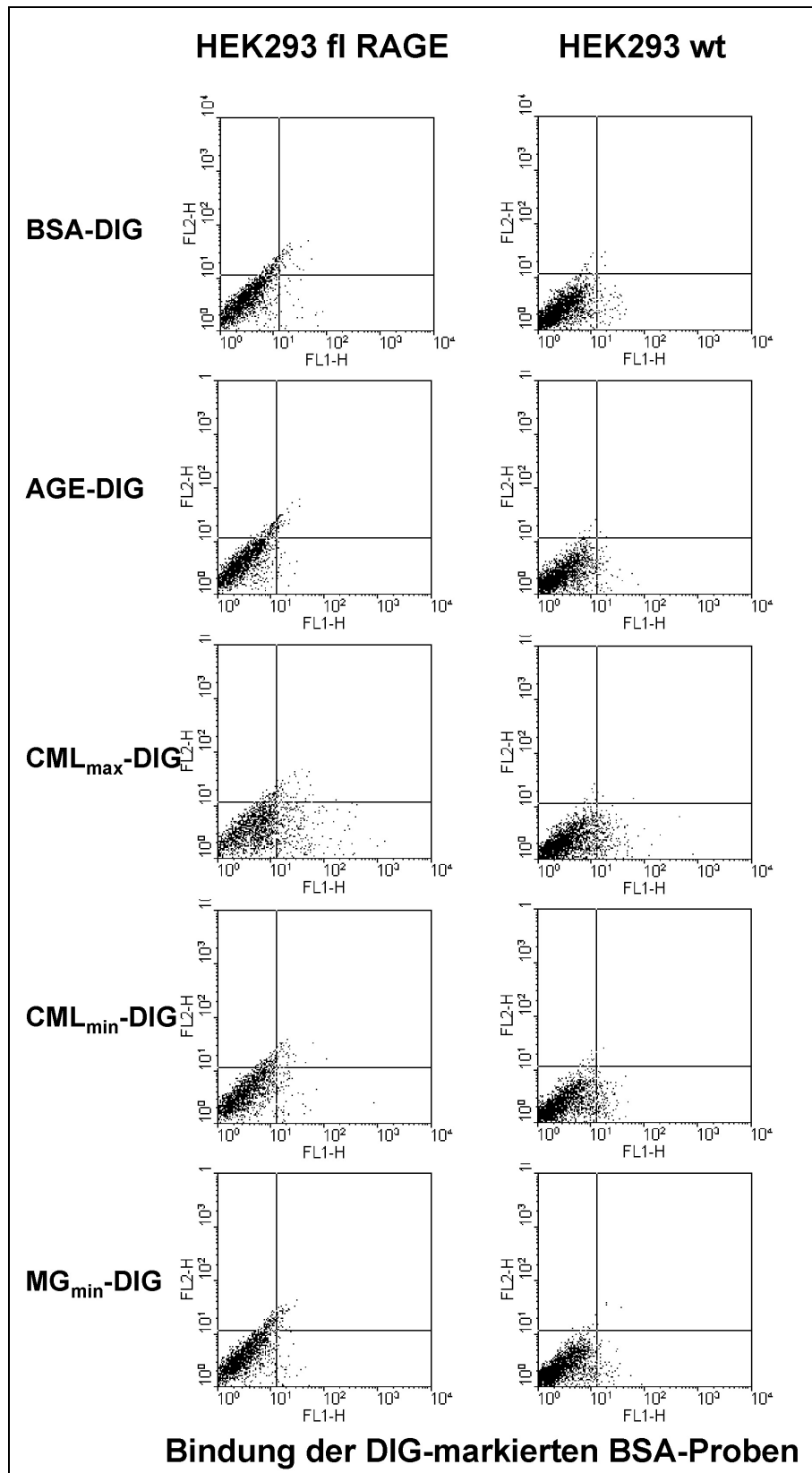


Abbildung 13. Zellbindungsstudien mit AGE-modifizierten Proben. HEK293 flRAGE transfizierte Zellen im Vergleich zu HEK293 wt Zellen wurden mit DIG-markierten AGE-modifizierten Proben (50 µg/ ml) inkubiert. Der Nachweis der Bindung erfolgte mittels FACS unter Verwendung eines FITC-konjugierten anti-DIG-Antikörpers (Roche, 1: 1000) und ist in der Abbildung als Fluoreszenzintensität im FL1-Kanal auf der x-Achse dargestellt.

3.7 Nachweis der AGE-Bindung über Zellaktivierungsstudien

Da keine spezifische Bindung der AGE-modifizierten BSA-Proben an sRAGE oder RAGE-exprimierende Zellen nachgewiesen werden konnte, sollte mit Hilfe der flRAGE-exprimierenden Zellen ein indirekter Nachweis über die Zellaktivierung nach Ligandenbindung erfolgen, was als sensitivere Methode eingeschätzt wurde. Hierfür wurden stabil mit flRAGE transfizierte HEK293 Zellen mit CML-modifiziertem BSA, das die bedeutendste Modifikation *in vivo* darstellt (Kislinger et al. 1999), inkubiert. Wie es für RAGE beschrieben ist, sollte es nach Ligandenbindung langfristig zu einer Zellaktivierung kommen, die im Falle der AGEs als Liganden letztendlich zu einer Translokation von NF κ B in den Kern führt. Ob eine solche Aktivierung aufgrund von CML in Abhängigkeit von RAGE ausgelöst werden konnte, wurde zunächst mittels eines kommerziell erhältlichen ELISAs untersucht, bei dem das in den Nukleus eingewanderte NF κ B in Kernextrakten der stimulierten Zellen gemessen wurde. Als Negativ-Kontrolle diente nicht-modifiziertes BSA; als Positiv-Kontrolle, um zu zeigen, dass der Nachweis generell funktionierte, wurden die Zellen mit TNF α stimuliert. Die Abhängigkeit der Zellaktivierung von RAGE sollte durch den Vergleich mit HEK293 wt Zellen demonstriert werden. Durch Inkubation mit CML wurde eine schwache Aktivierung der RAGE-exprimierenden Zellen hervorgerufen, die jedoch unspezifisch zu sein schien, da eine geringfügig höhere Aktivierung auch durch nicht-modifiziertes BSA erreicht wurde (Abb. 14A).

TNF α , ein potenter Aktivator des NF κ B-Transkriptionswegs (Renard and Raes 1999; Leong and Karsan 2000), führte wie erwartet zu einem hohen Aktivierungslevel der Zellen. Die HEK293 wt Zellen zeigten die gleiche Tendenz wie die HEK293 flRAGE Zellen, wenn auch insgesamt nur eine niedrigere Aktivierung erreicht wurde. Diese Beobachtung wurde in zwei weiteren, unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten bestätigt, die in Abbildung 14 A zusammengefasst wurden.

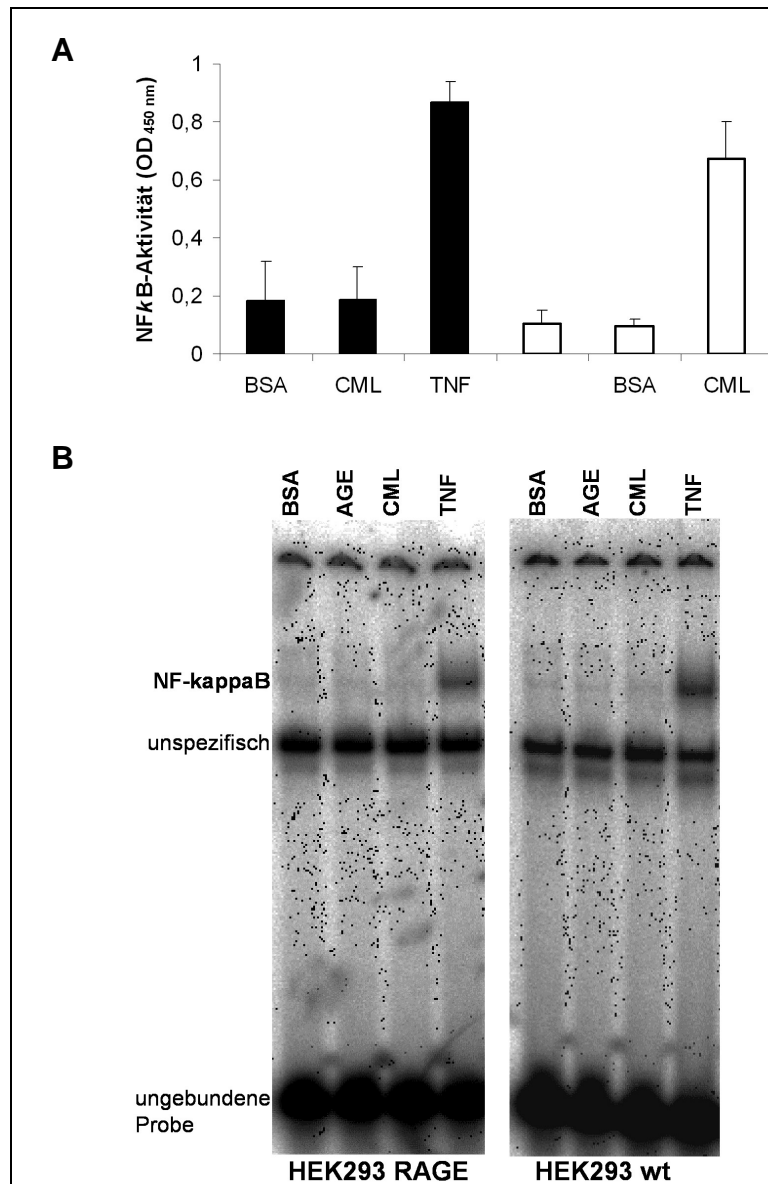


Abbildung 14. Untersuchung der Zellaktivierung nach AGE-Bindung. (A) HEK293 flRAGE Zellen (schwarz) im Vergleich zu HEK293 wt Zellen (weiß) wurden mit CML-modifiziertem BSA (100 µg/ ml Medium) für 6 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit nicht-modifiziertem BSA, als Positivkontrolle mit TNF α (10 ng/ ml) inkubiert, bevor Kernextrakte hergestellt wurden und mittels ELISA die Translokation von NF κ B in den Kern untersucht wurde. Die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten und die mittlere Standardabweichung der Einzelbestimmungen wurden dargestellt. (B) Die Zellen wurden wie in (A) behandelt, bevor die NF κ B-Aktivierung mittels EMSA untersucht wurde. Das Ergebnis eines EMSAs von vier repräsentativen Experimenten wurde dargestellt.

Eine weitere Methode, um die Aktivierung von NF κ B nachzuweisen, stellt der „Electromobility Shift Assay“ (EMSA) dar, wobei das in den Kern translozierte NF κ B hoch sensitiv über ein radioaktiv markiertes Oligo, das die Konsensussequenz der DNA-Bindungsstelle des aktivierten NF κ darstellt, untersucht wird. Auch hier wurden die HEK293 flRAGE Zellen im Vergleich zu HEK293 wt Zellen mit BSA, AGE-

modifiziertem BSA und CML-modifiziertem BSA, sowie der Positiv-Kontrolle $\text{TNF}\alpha$ inkubiert, und der Effekt auf die Zellaktivierung analysiert. Wie Abbildung 14 B zeigt, konnte, wie zuvor auch durch den ELISA demonstriert wurde, nur durch $\text{TNF}\alpha$ die Abspaltung des $\text{I}\kappa\text{B}$, und die darauf folgende Migration des $\text{NF}\kappa\text{B}$ in den Nukleus ausgelöst werden. Dies ergibt die diffuse Bande im oberen Viertel des auf Filterpapier übertragenen Gels. BSA, AGE-modifiziertes BSA und CML-modifiziertes BSA führten jeweils zu einer sehr schwachen Aktivierung, die allerdings sowohl bei RAGE-transfizierten als auch wt Zellen auftrat. Die bei allen Proben deutlich auftretende Bande mit niedrigerem Molekulargewicht als die durch $\text{TNF}\alpha$ hervorgerufene Bande, entspricht einer typischen Beobachtung bei EMSAs und wird generell als „unspezifisch“ bezeichnet. Somit konnte auch auf diesem indirekten Weg keine Interaktion der AGEs mit RAGE gezeigt werden.

3.8 Zellaktivierung über Quervernetzung des membranständigen RAGE

Das artifizielle Zellkultursystem der fRAGE transfizierten HEK293 Zellen bietet den Vorteil, dass ein direkter Vergleich zwischen Zellen möglich ist, die sich nur in der Expression des RAGE-Proteins unterscheiden, da wt Zellen, bzw. mock-transfizierte Zellen RAGE-negativ sind. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diesen Zellen Faktoren fehlen, die nativ RAGE-exprimierende Zellen aufweisen, und die für RAGE-abhängige Effekte nötig sind. Um zu untersuchen, ob HEK293 fRAGE Zellen generell in der Lage waren, RAGE-vermittelte Signalwege auszulösen, was durch die Stimulation mit AGEs bisher nicht gelang, sollten die membranständigen Rezeptoren mittels spezifischer anti-RAGE-Antikörper (mAk 9A11 und mAK 4F1) quervernetzt werden. Viele membranständige Rezeptoren, wie zum Beispiel der T-Zell-Rezeptor, werden durch Quervernetzung an der Zelloberfläche aktiviert, was schließlich eine intrazytoplasmatische Signalkaskade auslöst (Schade and Levine 2004; Magee et al. 2002). Hier sollte nun im Western Blot unter Verwendung Phospho-spezifischer Antikörper die phosphorylierte, also aktivierte Form der MAP-Kinase (p44/42) in Zellen nach unterschiedlich langer Kultivierung in anti-RAGE-Antikörper-beschichteten Kulturschalen nachgewiesen werden (Abb. 15). Als Positiv-Kontrolle dienten Zelllysate, die nach 15 min Inkubation mit 30 mM H_2O_2 hergestellt wurden, als Negativ-Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, sowie der Vergleich mit HEK293

wt Zellen. Unbehandelte Zellen verblieben wie erwartet in einem nicht-aktivierten Zustand, wohingegen H_2O_2 zu einer schnellen Phosphorylierung sowohl der fRAGE als auch der wt Zellen führte, was in der Abbildung 15 durch die Doppelbande bei 42 und 44 kD demonstriert wird. Die Inkubation in den mit 4F1 oder 9A11 beschichteten Platten führte zu keiner Aktivierung der p44/42 MAP-Kinase in den HEK293 fRAGE oder wt Zellen. Selbst wenn die Zelllysate nach zweistündiger Kultivierungszeit hergestellt wurden, trat keine Phosphorylierung auf.

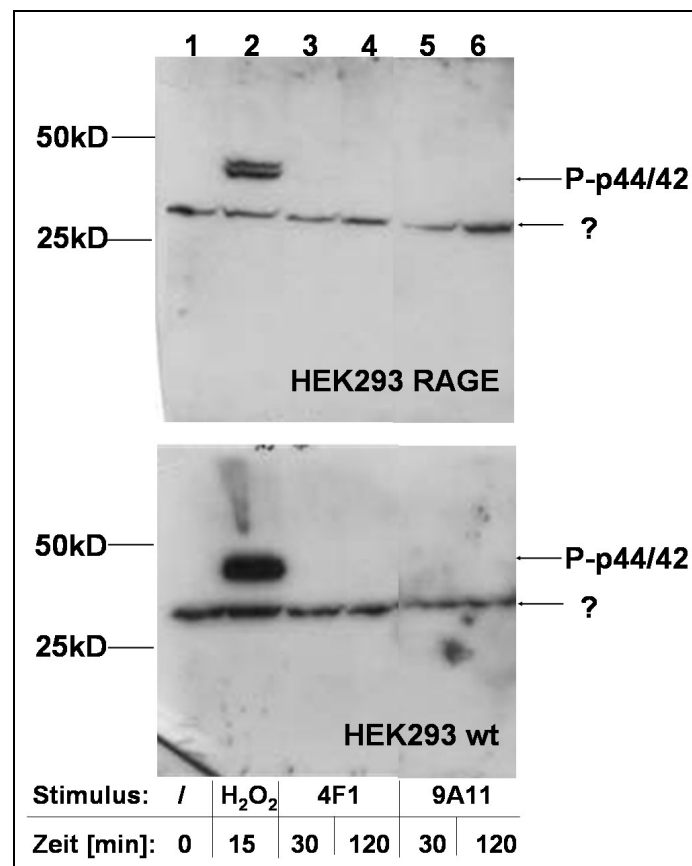
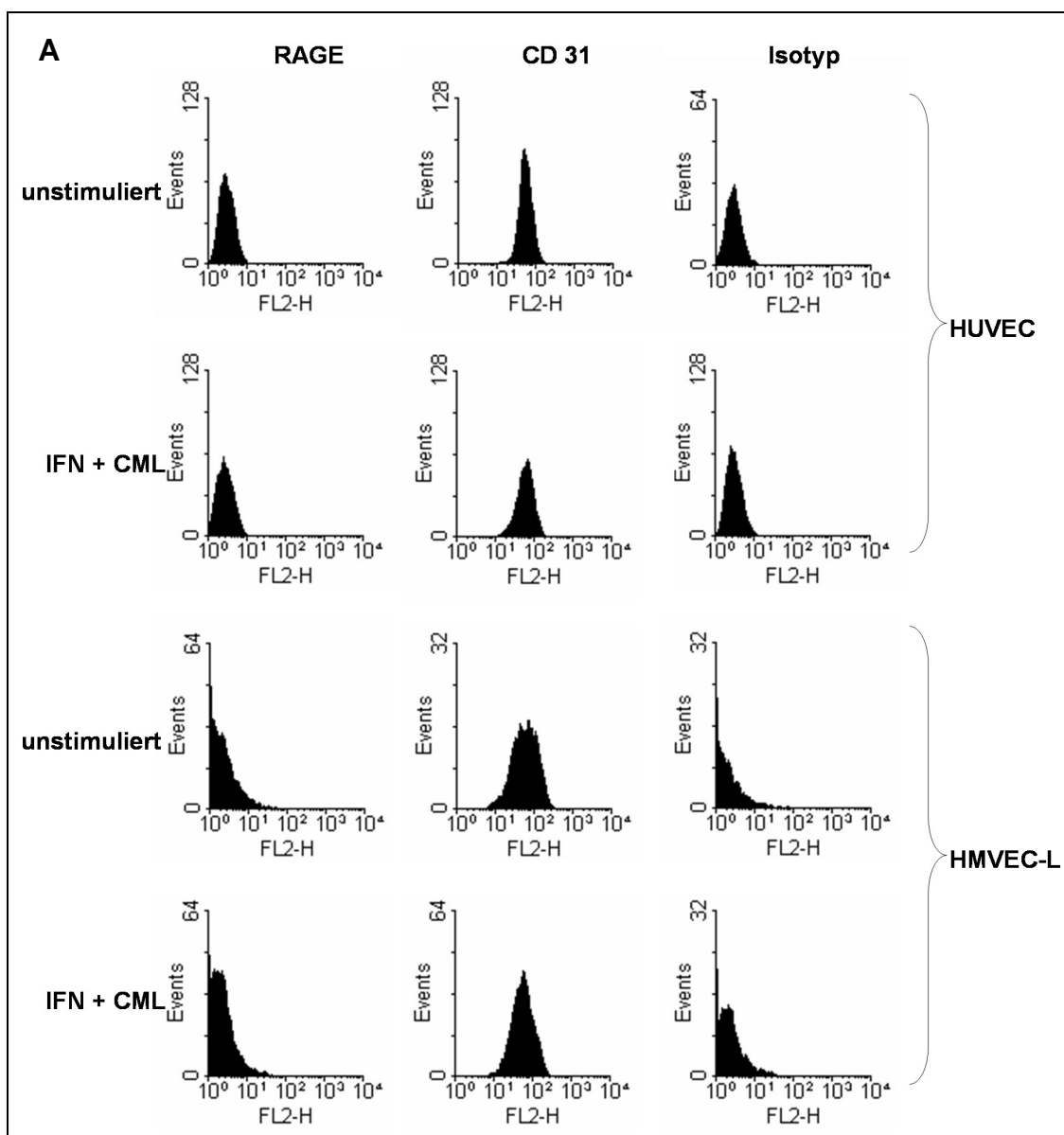


Abbildung 15. Zellaktivierung nach RAGE-Quervernetzung. Zelllysate von HEK293 fRAGE (oben) bzw. HEK293 wt (unten) Zellen wurden mittels Western Blot ohne Stimulierung (Spur 1), nach 15 min Inkubation mit H_2O_2 (Spur 2), bzw. nach den angegebenen Inkubationszeiten in anti-RAGE mAK 4F1-beschichteten (Spuren 3 – 4) oder 9A11-beschichteten (Spuren 5 – 6) Kulturschalen auf die Phosphorylierung der MAPK p44/42 untersucht. Hierfür wurde ein monoklonaler Antikörper eingesetzt, der spezifisch die phosphorylierte Form von p44/42 erkennt (Cell Signaling; 1:2000). Als Sekundärantikörper diente ein HRP-konjugierter Kaninchen-anti-Maus Antikörper (Dako, 1:1000). Die Doppelbande bei ~44 kD entspricht der phosphorylierten Form der p44/42 MAP Kinase (Pfeil P-p44/42). Die Bande bei ungefähr 30 kD, die durch das Fragezeichen gekennzeichnet ist, wurde auf eine Kreuzreaktion mit HEK293 Zellen zurückgeführt, die unabhängig von der Phosphorylierung erkannt wird. Ein Western Blot von vier vergleichbaren Experimenten ist gezeigt.

3.9 RAGE Expression in Endothelzellen und Monozyten (FACS)

Nachdem keine effiziente Aktivierung der HEK293 fRAGE-transfizierten Zellen durch AGEs erreicht werden konnte, sollte der Rezeptor in Endothelzellen untersucht werden, die laut Literatur die höchste native Expression aufweisen (Brett et al. 1993). Die Endothelzellen sollten dann anstelle des artifiziellen Zellkultursystems in Funktionsstudien eingesetzt werden. Hierfür wurden frisch isolierte HUVEC, sowie die Primär-Zelllinie HMVEC-L sowohl unstimuliert als auch nach 24 h Inkubation mit $\text{IFN}\gamma$ und CML mittels FACS analysiert (Fig. 16A).



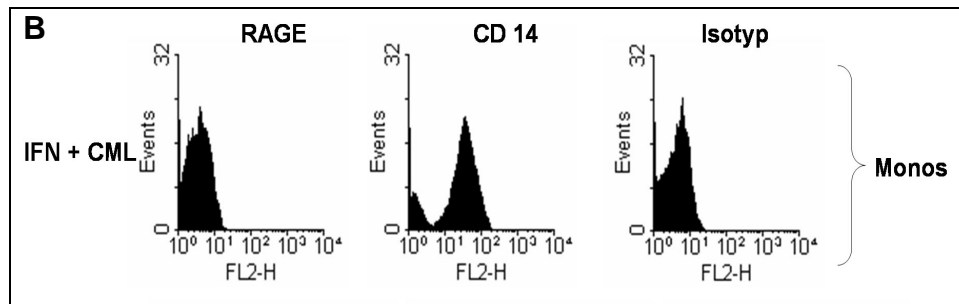


Abbildung 16. Untersuchung der RAGE-Expression mittels FACS-Analyse. (A) Frisch isolierte HUVEC und die Primärzelllinie HMVEC-L wurden entweder ohne Zugaben von Stimulantien oder in Anwesenheit von 100 ng/ ml $\text{INF}\gamma$ und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CML für 24 h kultiviert. Anschließend wurde die RAGE-Expression in den so behandelten Zellen mit Hilfe des mAk 9A11 (unverdünnter Hybridomüberstand) mittels FACS untersucht. Als Positivkontrolle diente der Endothelzellmarker CD31, als Negativkontrolle wurde eine IgG1 Isotyp-Kontrolle eingesetzt. (B) Aus Blut isolierte Monozyten wurden wie die Endothelzellen stimuliert und mit dem mAk 9A11 gefärbt. Als Positivkontrolle wurde der Monozytenmarker CD14 eingesetzt, die Negativkontrolle war wiederum die IgG1 Isotyp-Kontrolle. Der Nachweis der Bindung der Primärantikörper erfolgte in allen Fällen mit Hilfe eines Cy3-markierten Sekundärantikörpers (Dianova, 1:100), so dass die Fluoreszenzintensität des FL2-Kanals auf der x-Achse dargestellt ist.

Für den Nachweis von RAGE diente der mAk 9A11, außerdem wurde der Endothelzellmarker CD31 als Positiv-Kontrolle eingesetzt. Es konnte keine RAGE-Expression nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise ließ sich die Expression auch nicht durch die Stimulation induzieren. Als weiterer RAGE-exprimierender Zelltyp sind Monozyten beschrieben (Brett et al. 1993; Ritthaler et al. 1995). Für die Untersuchung von RAGE wurden Monozyten aus peripheren Blut-Mononukleären Zellen (PBMC; peripheral blood mononuclear cells) mittels Plastik-Adhärenz isoliert und dann wie die Endothelzellen stimuliert, bevor die RAGE-Expression analysiert wurde (Fig. 16B). Die Oberflächenexpression des CD14 diente der Bestätigung der Monozyten-Population, so dass andere Zelltypen ausgeschlossen werden konnten. Mit Hilfe des mAk 9A11 konnte auch auf diesen Zellen keine RAGE-Expression gezeigt werden.

3.10 RAGE Expression in verschiedenen Zelltypen (Western Blot)

Weder in Endothelzellen noch in Monozyten konnte RAGE an der Zelloberfläche detektiert werden. Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurde nun geprüft, ob RAGE in kompletten Zelllysaten verschiedenster Zellen, teilweise nach Stimulation, nachgewiesen werden konnte (Abb. 17). Durch diesen Ansatz wurde gewährleistet, dass das gesamte RAGE-Protein erfasst wurde, im Gegensatz zu den FACS-Analysen, bei denen nur der membranständige Rezeptor gemessen wurde. RAGE-Protein konnte spezifisch in HEK293 fRAGE Zelllysaten nachgewiesen werden, die

als Positivkontrolle dienten, es konnte dagegen nicht in HEK293 wt Zellen, die als Negativ-Kontrolle eingesetzt wurden, und ebenso nicht in HUVEC, in den Zelllinien L132 und NHLF (Abb. 17A), noch in unterschiedlich stimulierten Monozyten oder frisch isolierten dendritischen Zellen (DC) (Abb. 17B) detektiert werden. In beiden Western Blots wurde gereinigter sRAGE mitgeführt, der ebenso als Positiv-Kontrolle diente und von dem mAk erkannt wurde. Somit konnte das RAGE-Protein bis jetzt weder in nativer Form an der Zelloberfläche noch in denaturierter Form in kompletten Zelllysaten verschiedener Zelltypen demonstriert werden und die beschriebene Lokalisation des Rezeptors nicht bestätigt werden.

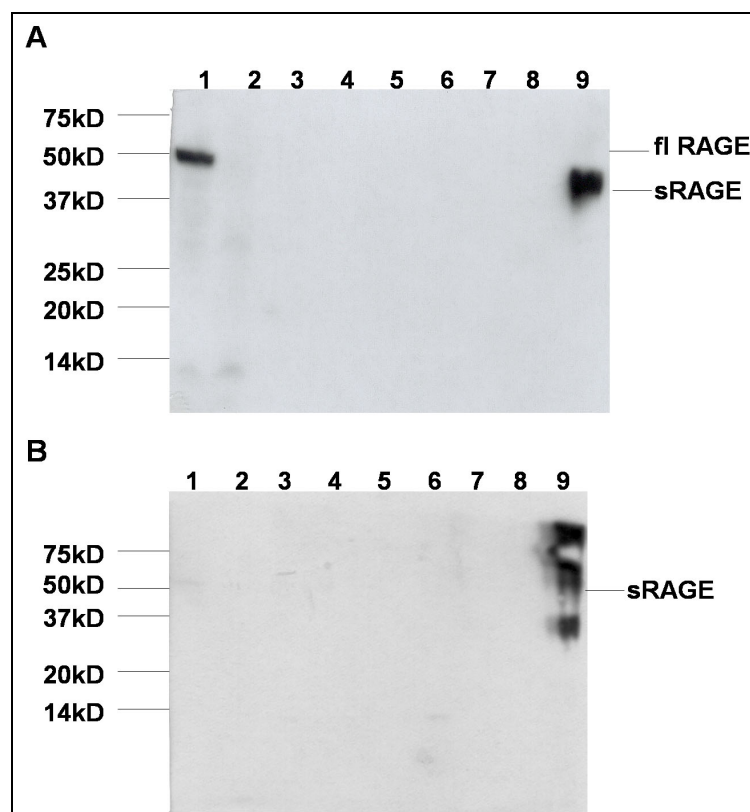


Abbildung 17. Untersuchung der RAGE-Expression in verschiedenen Zelltypen mittels Western Blot. PBMC-Fractionen, frisch isolierte Endothelzellen, sowie immortalisierte Zelllinien wurden einbezogen. Jeweils 50 µg Gesamtprotein der Zelllysate wurden auf 10 % (A) bzw. 12 % (B) SDS-Gele aufgetragen und anschließend im Western Blot unter Verwendung des mAK 9A11 (Hybridomüberstand 1: 20 verdünnt) und einem HRP-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (DAKO, 1:1000) analysiert. (A) Spur 1: HEK293 flRAGE; Spur 2: HEK293 wt; Spur 3: L132; Spur 4: frei; Spur 5: HUVEC, nach 24 h Stimulation mit 100 µg/ ml CML; Spur 6: NHLF; Spur 7: NHLF, nach 24 h Stimulation mit 100 µg/ ml CML; Spur 8: frei; Spur 9: sRAGE gereinigt, 0,5 µg. (B) Spur 1: isolierte Monozyten nach 5 Tagen Kultivierung und Ausreifung zu von Monozyten-abstammenden dendritischen Zellen (Mo-DC); Spur 2: Monozyten, nach 48 h Stimulation mit 0,3 µg/ ml LPS; Spur 3: Monozyten, nach 48 h Stimulation mit 10 ng/ ml TNF α ; Spur 4: Monozyten, nach 48 h Stimulation mit 1000 U/ ml Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF); Spur 5: Monozyten, nach 48 h gleichzeitiger Stimulation mit 100 ng/ ml IFN γ und 0,3 µg/ ml LPS; Spur 6: Monozyten, die über CD14⁺-Beads gereinigt wurden; Spur 7: PBMC ohne dendritische Zellen; Spur 8: aus PBMC isolierte Dendritische Zellen; Spur 9: sRAGE gereinigt (1,5 µg).

3.11 Gewebe-Verteilung von RAGE

Die bisherige Analyse der RAGE-Expression auf Protein-Ebene, die im Widerspruch zu der in der Literatur beschriebenen Verteilung (Brett et al. 1993) und den vielfältigen Funktionen dieses Rezeptors steht, veranlasste die Untersuchung der RAGE-Expression in verschiedenen humanen Geweben auf einer quantitativen Basis. Hierfür wurde die *RAGE* mRNA mittels „real time“ RT-PCR in einem Panel normalisierter cDNAs gesunder Spender, das 16 verschiedene Gewebe repräsentiert, bestimmt (Abb. 18A).

Da bisher mindestens drei Splice-Varianten von *RAGE* bekannt sind, wurden zwei Primerpaare eingesetzt, die alle möglichen Splice-Produkte erfassen sollten. Ein hohes Expressionslevel wurde nur in Lungengewebe gemessen, wobei beide Primerpaare sehr ähnliche Ergebnisse lieferten. Alle anderen Gewebe, unter anderem auch Hirn-Gewebe, wo dem Rezeptor RAGE eine bedeutende Rolle bei Neuriten-Wachstum, aber auch bei pathologischen Bedingungen wie der Alzheimer Krankheit zugesprochen wurde (Sasaki et al. 2001; Yan et al. 1996), wiesen nur geringste Transkript-Mengen auf.

Neben dem kommerziell erhältlichen cDNA Panel, das nur Gewebe-Präparationen enthielt, wurde auch RNA aus unstimulierten und wie zuvor stimulierten HUVEC, und zum Vergleich aus humanen Lungenzellen zweier Spender isoliert, in cDNA umgeschrieben und in Light Cycler Analysen eingesetzt (Abb. 18B). Aufgrund der vergleichbaren Ergebnisse beider Primerpaare in der vorherigen Untersuchung wurde in weiteren Analysen nur ein Primerpaar eingesetzt, wobei ohne erkennbaren Vorteil das Primerpaar RAqu_2 gewählt wurde. Die mRNA Expressionslevel wurden auf die Expression des Haushaltsgens *GAPDH* normalisiert. Wieder wurde ein sehr hohes Expressionslevel in Lungenzellen erreicht, während im Gegensatz dazu HUVEC nahezu keine *RAGE* mRNA aufwiesen. Dies traf auch dann zu, wenn RNA aus Zellen isoliert wurde, die zuvor mit CML und IFN γ inkubiert wurden, was laut Literatur die *RAGE*-Transkription induzieren sollte (Hudson et al. 2003; Kislinger et al. 1999).

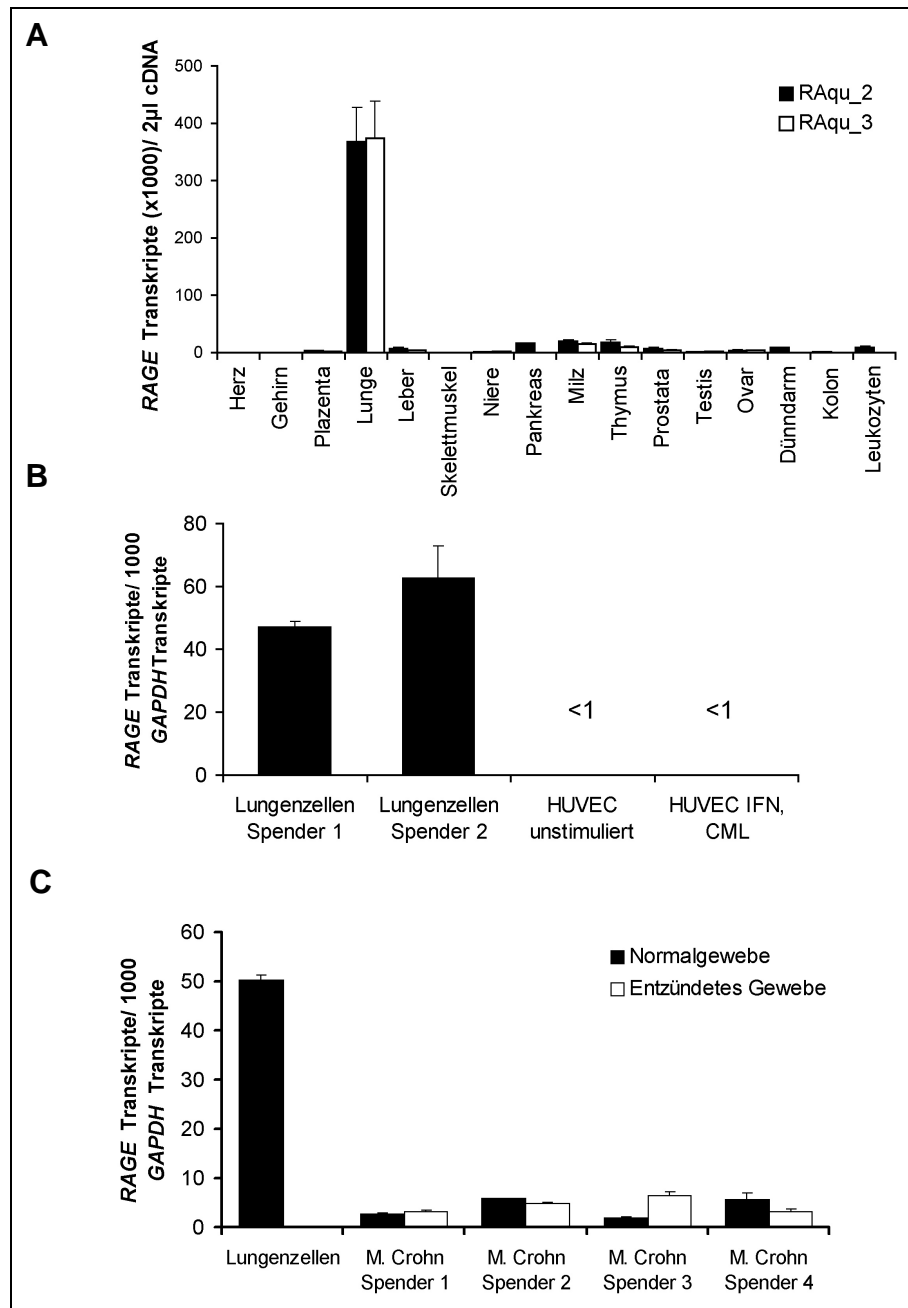


Abbildung 18. Expression von RAGE in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen ermittelt durch „real time“ RT-PCR. (A) Für den quantitativen Vergleich der *RAGE* mRNA Expression in 16 Geweben gesunder Spender wurden zwei *RAGE*-spezifische Primer-Paare verwendet. Der RAqu_2- (schwarz) Vorwärtsprimer bindet in Exon 7, der Rückwärtsprimer in Exon 9, der RAqu_3- (weiß) Vorwärtsprimer bindet in Exon 1, der Rückwärtsprimer in Exon 3 der *RAGE*-Sequenz. Die cDNAs stammten jeweils von mehreren Spendern und waren komplett gegen fünf Haushaltsgene normalisiert (siehe Material und Methoden). (B) Das Primer-Paar RAqu_2 wurde weiterhin für die Untersuchung der *RAGE*-Expression in kultivierten Alveolarzellen von zwei Spendern im Vergleich zur Expressionsstärke in HUVEC eingesetzt. HUVEC wurden entweder unbehandelt kultiviert oder 24 h mit CML (100 µg/ ml) und IFN γ (10ng/ ml) stimuliert, bevor die RNA isoliert wurde. (C) Ebenfalls mit dem RAqu_2 Primerpaar wurde die Expression von *RAGE* in gesundem und entzündetem Gewebe von vier verschiedenen Spendern mit M.Crohn untersucht. Die cDNAs wurden dankenswerterweise von PD Dr. H. Diepolder (Medizinische Klinik II, Klinikum Großhadern, LMU München) bereitgestellt. In (B) und (C) wurden die Transkriptmengen von *RAGE* mit den Transkriptmengen von *GAPDH* in 2 µl cDNA verglichen.

Die Mittelwerte von jeweils zwei unabhängigen Experimenten und die mittlere Standardabweichung der Einzelbestimmungen sind dargestellt.

RAGE wird eine zentrale Rolle in Entzündungsprozessen zugesprochen (Schmidt et al. 2001). Insbesondere bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen wurde oftmals ein entzündungsverstärkender Effekt von RAGE festgestellt, der auf eine Hochregulation des Rezeptors nach Liganden-Interaktion in betroffenen Geweben zurückgeführt wurde. Unter Anderem in Darmgewebe von Morbus Crohn-Patienten wurde eine erhöhte Expression von RAGE in entzündetem Gewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe beschrieben (Thiele 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde daher zusätzlich zu der Untersuchung der gesunden Gewebe, die *RAGE*-Expression auf mRNA-Ebene in cDNA-Proben, die aus Darmgewebe von Patienten mit M. Crohn erhalten wurden, quantitativ bestimmt. Im Vergleich zu der hohen Expression in isolierten Lungenzellen trat unabhängig davon, ob die cDNA aus gesundem oder entzündetem Gewebe gewonnen wurde, eine 10- bis 30-fach niedrigere Expression in den cDNA-Proben des Darmgewebes auf.

Die bisherigen Schwierigkeiten in dieser Arbeit, RAGE-Protein in Zellen zu detektieren, und die Beschreibung einer deutlichen Expression von RAGE Protein bei nur in geringen Mengen nachweisbaren *RAGE* mRNA in den meisten Geweben (Brett et al. 1993), ließen es notwendig erscheinen, RAGE-Protein in Lungengewebe zu untersuchen, um zu prüfen ob die hohen mRNA Expressionslevel mit hoher RAGE-Protein-Expression korrelierten. Hierfür wurden Lysate aus gesundem, humanem Lungengewebe hergestellt und in Western Blot Analysen mit Hilfe des mAk 9A11 und im Vergleich zu einem polyklonalen anti-RAGE-Ziegenserum analysiert. Als Positiv-Kontrolle wurden Lysate von HEK293 fRAGE Zellen, als Negativ-Kontrolle von HEK293 wt Zellen mitgeführt (Abb. 19).

Beide anti-RAGE-Antikörper, sowohl der monoklonale, wie auch der polyklonale, erkannten eine spezifische Bande bei ~55 kD in dem Lungenlysat, die der Höhe der Bande der fRAGE-transfizierten Zelllysate entsprach, während HEK293 wt Zellen keine Reaktivität zeigten. Nachdem bis dahin in dieser Arbeit der Rezeptor nur in transfizierten, RAGE-überexprimierenden Zellen detektiert werden konnte, konnte nun in Lungengewebe zum ersten Mal die endogene Expression des RAGE-Proteins nachgewiesen werden.

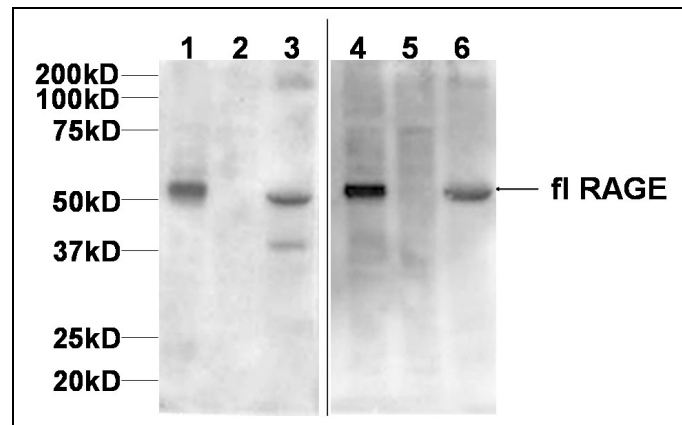


Abbildung 19. Expression von RAGE-Protein in Lungengewebe ermittelt durch Western Blot. Spuren 1 und 4: 50 µg Lysat von HEK293 flRAGE Zellen; Spuren 2 und 5: 50 µg Lysat von HEK293 wt Zellen; Spuren 3 und 6: 60 µg Lysat von gesundem humanem Lungengewebe. Nach dem Blotten wurden Spuren 1–3 mit einem polyklonalen Ziege-anti-RAGE-Antiserum (großzügige Gabe von Dr. M.A. Shearman, Merck; Sharp and Dome, Essex, UK: 1:10000) und Spuren 4–6 mit dem mAk 9A11 analysiert. Als Sekundärantikörper dienten HRP-konjugierte Kaninchen-anti-Ziege-, bzw. Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (beides Dako; 1:1000).

Die Expression in Lunge war schon in der Literatur beschrieben, tatsächlich wurde RAGE ursprünglich aus Lunge, als einem besonders endothelreichem Gewebe isoliert (Schmidt et al. 1992). Um so überraschender war der Befund, dass in den untersuchten Endothelzellen weder *RAGE* mRNA noch RAGE-Protein detektiert werden konnte. Die fast selektive und sehr starke Expression in der Lunge führten zu der Frage nach der zellulären Lokalisation von RAGE in Lungengewebe und ebenso nach einer physiologischen Funktion an diesem Ort, über die in der Literatur bislang keine Daten vorliegen.

3.12 Zelluläre Lokalisation von RAGE in der Lunge

Die RAGE-exprimierenden Zelltypen in der Lunge sind derzeit noch nicht eindeutig definiert. Wie bereits geschildert, wurde RAGE ursprünglich aus Lungengewebe isoliert, da dieses als Endothelzell-reich gilt. Spätere Studien dagegen beschrieben die RAGE-Expression auf Epithelzellen der Lunge, wobei einerseits AT I Zellen (siehe S. 15, Einleitung) (Dahlin et al. 2004; Fehrenbach et al. 1998; Shirasawa et al. 2004), andererseits AT II Zellen als RAGE-positiv identifiziert wurden (Katsuoka et al. 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der hoch spezifische mAk 9A11, der sich als besonders geeignet für den Nachweis von nativem RAGE an der Zelloberfläche erwies (Vgl. Abb. 8), in Doppel-Immunfluoreszenz-Analysen eingesetzt. Gefrierschnitte von gesundem, humanem Lungengewebe wurden parallel mit dem

mAk 9A11 und schon bekannten spezifischen Marker-Antikörpern gegen bestimmte Zelltypen (Kasper and Singh 1995) gefärbt (Abb. 20). Der mAk 9A11 (grüne Fluoreszenz) interagiert nicht mit Endothelzellen, die spezifisch durch den Marker Podocalyxin (rote Fluoreszenz) (Horvat et al. 1986) gefärbt wurden (Abb. 20a). Das in der Abbildung dargestellte bronchiale Gewebe (durch Pfeile gekennzeichnet) wurde durch keinen der beiden Antikörper markiert. AT II Zellen, die durch einen polyklonalen Antikörper gegen SP-C (rote Fluoreszenz) identifiziert wurden, waren vollständig negativ für RAGE (Abb. 20b). Dagegen trat eine Überlagerung der Fluoreszenz auf, wenn das Gewebe mit einem polyklonalen anti-Pan-Keratin-Antikörper (rote Fluoreszenz) und dem mAk 9A11 (grüne Fluoreszenz) inkubiert wurde (Abb. 20c). Dieses Färbemuster deutete stark auf eine selektive Expression von RAGE in AT I Zellen hin.

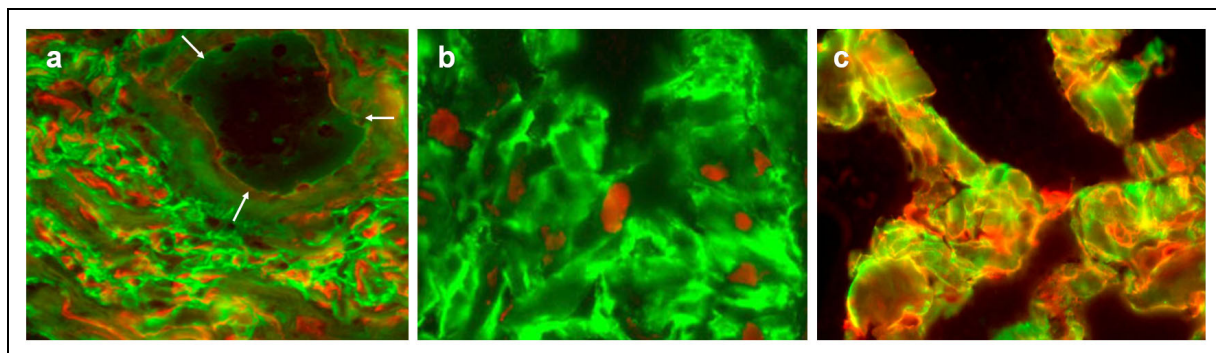


Abbildung 20. Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen humaner Lungengefrierschnitte. Gefrierschnitte von humaner Lunge wurden parallel mit dem mAk 9A11 (grüne Fluoreszenz; unverdünnter Hybridomüberstand) und Antikörper gegen das (a) Endothelzell-Markerprotein Podocalyxin (rote Fluoreszenz), (b) gegen das spezifisch von AT II Zellen synthetisierte SP-C (rote Fluoreszenz), bzw. (c) gegen den Epithelzellmarker Keratin (rote Fluoreszenz) gefärbt. Die Pfeile in (a) zeigen einen Bronchus.

Für Hinweise auf eine mögliche Funktion des Rezeptors auf diesen polarisierten Epithelzellen war es von Bedeutung, ob RAGE an der apikalen oder basalen Membran lokalisiert war. Hierfür wurden Doppelfärbungen von HOPE-fixierten humanen Lungenschnitten (Goldmann et al. 2003) mit dem mAk 9A11 (grüne Fluoreszenz) und dem rot fluoreszierenden Lektin *Lycopersicon esculentum* Agglutinin (LEA), auch Tomatenlektin genannt, durchgeführt, das spezifisch an die apikale Membran von AT I Zellen und an Alveolarmakrophagen bindet (Bankston et al. 1991), (Abb. 21a und b).

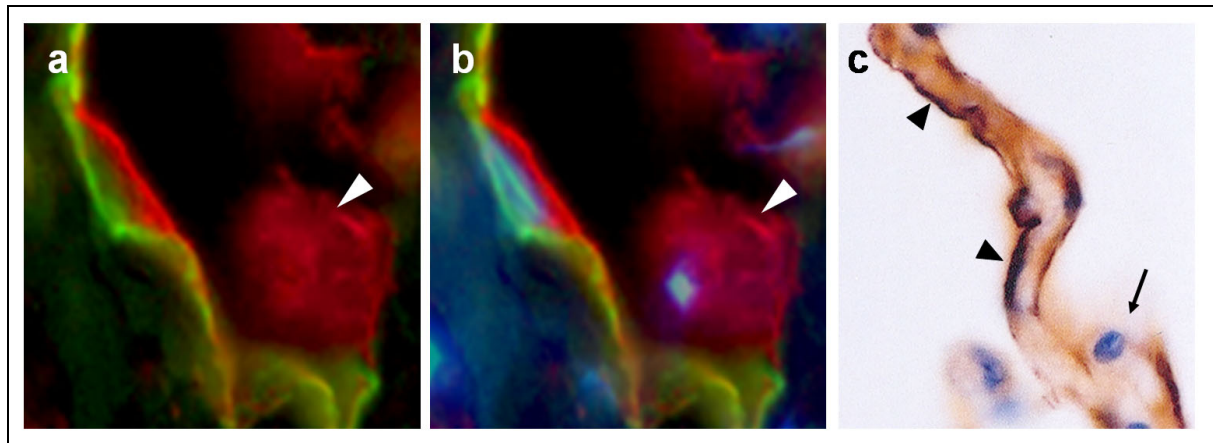


Abbildung 21. Immunfluoreszenz- und Immunhistochemie-Untersuchung von „HOPE“-fixierten Paraffinschnitten normaler humaner Lunge. Die Schnitte wurden gleichzeitig mit *Lycopersicon esculentum* Agglutinin (LEA) (rote Fluoreszenz) und dem mAk 9A11 gefärbt (a und b). Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (b). Der Pfeilkopf in (a) und (b) zeigt einen Alveolarmakrophagen. (c) Immunperoxidase-Färbung der „HOPE“-fixierten Schnitte mit dem mAk 9A11. AT I Zellen sind durch die Pfeilköpfe angedeutet, eine AT II Zelle, die nicht durch den mAk 9A11 gefärbt wurden, ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

In Zellen, in denen die apikale und basale Membran durch den Kern getrennt sind, was in Abb. 21b durch die Gegenfärbung des Kerns mit DAPI demonstriert wurde, konnte RAGE nicht an der apikalen Membran, die durch LEA gefärbt wurde, nachgewiesen werden. Statt dessen markierte der mAk 9A11 selektiv die gegenüberliegende, basale Membran. Alveolarmakrophagen (Pfeilkopf in Abb. 21a und b) wurden durch LEA, nicht aber den mAk 9A11 gefärbt. Immunhistochemische Untersuchungen der HOPE-fixierten Schnitte zeigten ebenfalls die Färbung der Membran der AT I Zellen (Pfeilköpfe) mit dem mAk 9A11, während die Membranen der AT II Zellen (Pfeil), die durch einen runden Zellkern charakterisiert sind, ungefärbt blieben (Abb. 21c).

3.13 RAGE-Expression während der Transdifferenzierung von AT II zu AT I Zellen

Trotz der Tatsache, dass AT I Zellen den Großteil der Alveolar-Oberfläche bedecken und eine entscheidende Rolle für den Gasaustausch spielen, sind sie hinsichtlich weiterer funktioneller Eigenschaften weniger gut charakterisiert, da bis vor kurzem spezifische Marker für AT I Zellen fehlten. Daraus resultierte die Schwierigkeit, AT I Zellen in größerer Zahl und hoher Reinheit zu isolieren. Des Weiteren stehen keine (humanen) immortalisierten Zelllinien für Untersuchungen zur Verfügung (Williams 2003). Abhilfe schuf die Beobachtung, dass isolierte AT II Zellen *in vitro* in AT I-

ähnliche Zellen differenzieren können (Danto et al. 1995; Forbes 2002). Während dieses Prozesses, der als Transdifferenzierung bezeichnet wird, durchlaufen die AT II Zellen innerhalb einer acht bis zehn Tage dauernden Kultivierung morphologische und biochemische Veränderungen, wie den Verlust von „Lamellar Bodies“ und damit einhergehend die Produktion von Surfactant. Dafür formen die Zellen im Laufe der Kultivierung konfluente Schichten, wobei sie „tight junctions“ ausbilden und hohe transepitheliale Resistenz (TEER) aufweisen (Elbert et al. 1999). Letztendlich exprimieren die Zellen mehr Typ I Zellmarker und sind durch eine vergrößerte Zelloberfläche mit den typischen Ausläufern charakterisiert, weshalb diese als AT I-ähnliche Zellen bezeichnet werden (Cheek et al. 1989; Ehrhardt et al. 2004; Fuchs et al. 2003).

Durch die Kooperation mit C. Ehrhardt (Universität des Saarlands, Saarbrücken) bot sich die Möglichkeit, die RAGE-Expression in diesem *in vitro* Modell von humanen Alveolarepithelzellen (hAEPc) während der Transdifferenzierung von AT II Zellen in AT I-ähnliche Zellen zu verfolgen und die Beobachtung der restriktiven Expression auf AT I Zellen in Lungengefrierschnitten zu bestätigen.

In ersten Experimenten wurden die Zellen nach Isolation in Kultur genommen und an Tag 3, 6 und 8 mit dem mAk 9A11 gefärbt (Abb. 22A). Während am dritten Tag der Kultur kaum RAGE auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden konnte (Abb. 22A a), wurde die RAGE-Färbung an Tag 6 deutlich erkennbar (Abb. 22A b) und nahm bis zum Tag 8 noch an Intensität zu (Abb. 22A c).

In einem weiteren Experiment wurde die RAGE-Expression an Tag 3 und Tag 8 mit weiteren etablierten Markerproteinen sowohl für AT I als auch AT II Zellen verglichen. Die Zellen wurden wieder mit dem mAk 9A11 und parallel mit Antikörpern gegen Caveolin-1 (AT I Zellen) (Campbell et al. 1999) bzw. SP-D (AT II Zellen) gefärbt (Abb. 22B). Bis zum dritten Tag in Kultur repräsentieren laut Fuchs *et al.* die Zellen eher die AT II spezifischen Eigenschaften und die entsprechende Morphologie (Fuchs et al. 2003). Damit korrelierend zeigten sie hier eine starke Reaktivität mit dem SP-D-Antikörper (Abb. 22B e), wohingegen kaum RAGE (Abb. 22B a) noch Caveolin-1 (Abb. 22B c) detektiert werden konnten. Am Tag 8 war die Färbung des SP-D fast komplett reduziert (Abb. 22B f), während die Reaktivität mit dem anti-Caveolin-Antikörper (Abb. 21B d) und noch mehr mit dem mAk 9A11 (Abb. 22B b) stark erhöht war. Parallel dazu bildeten die Zellen in diesem späteren Kultivierungsstadium eine flache, fast geschlossene Zellschicht auf der Filteroberfläche verglichen mit den

quaderförmigen, weniger konfluenten Zellen an den früheren Tagen nach der Isolation. Diese Beobachtung stimmt mit der Morphologie-Beschreibung für AT I und AT II Zellen überein. Weiterhin bestätigte die Untersuchung der *RAGE* mRNA-Level in Zellen von zwei Spendern die fortschreitende Erhöhung der RAGE-Protein-Expression. Quantitative PCR Analysen spiegelten den Anstieg der *RAGE*-Transkripte von einem niedrigen Level an Tag 3 bis zu außerordentlich hohen Transkriptmengen an Tag 8 wider (Abb. 22 C).

Die Beobachtungen der selektiven Expression in Lungengewebe und der Zelltyp-spezifischen Lokalisation von RAGE führen zu der begründeten Annahme, dass RAGE als hoch selektiver Marker für humane AT I Zellen eingesetzt werden kann.

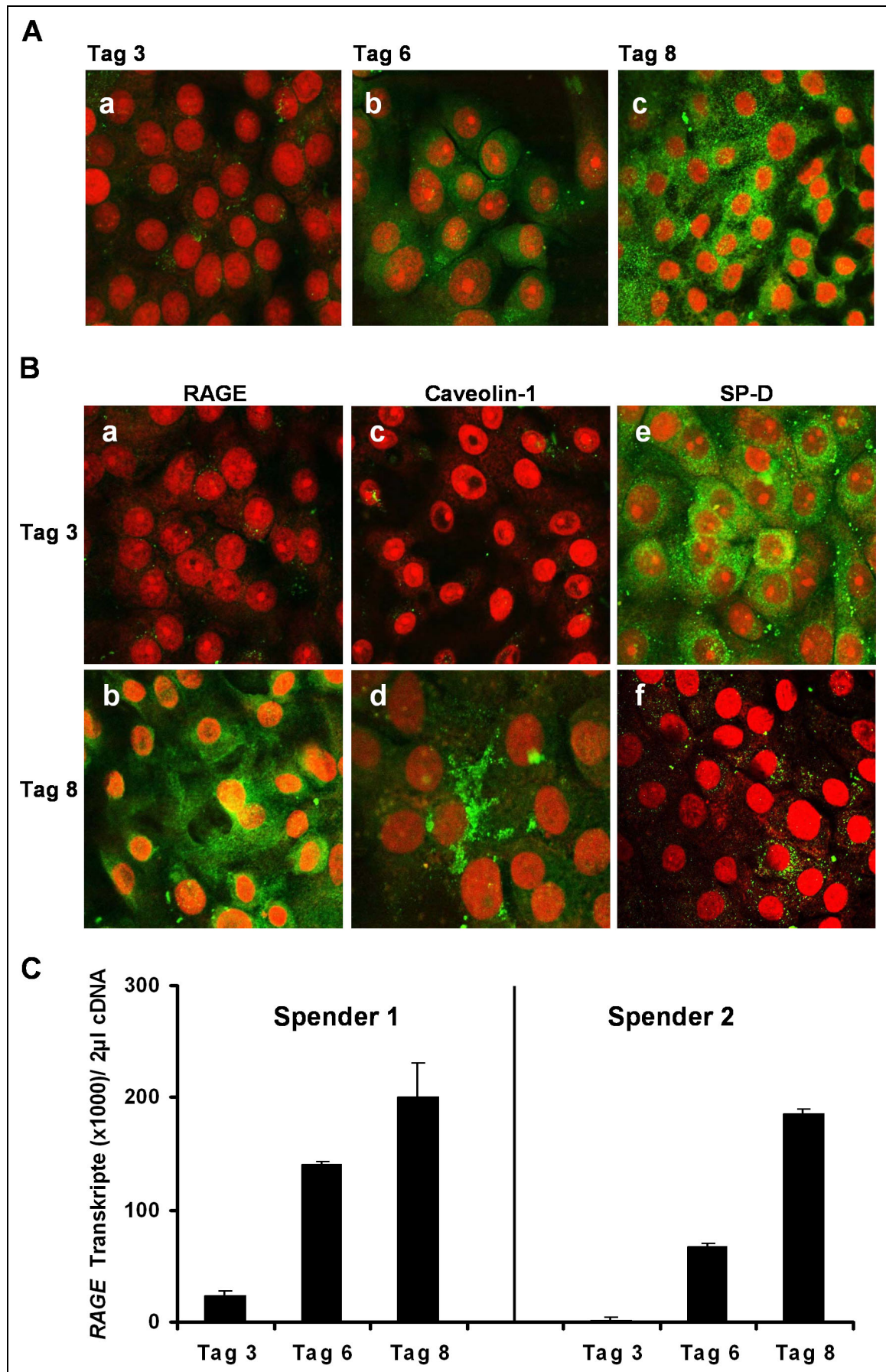


Abbildung 22. RAGE-Expression in kultivierten humanen Alveolarepithelzellen (hAEpC). (A) Immunfluoreszenzfärbung des RAGE-Proteins (grüne Fluoreszenz) in *in vitro* kultivierten Alveolarepithelzellen unter Verwendung des mAk 9A11 an Tag 3 (a), Tag 6 (b) und Tag 8 (c). Die Zellkerne wurden mit PI gegengefärbt. (B) Neben der RAGE-Expression (a, b) wurde die Expression von Caveolin-1 (c, d) und SP-D (e, f) in hAEpC an Tag 3 (a, c, e), bzw. an Tag 8 (b, d, f) nach Aussaat der Zellen untersucht. Die Immunreaktivität mit den entsprechenden Antikörpern ist als grüne Fluoreszenz dargestellt, die Zellkerne erscheinen durch die Gegenfärbung mit PI als rote Fluoreszenz. (C) Analyse der RAGE-Expression in isolierten Alveolarepithelzellen im Laufe der Kultivierung mittels quantitativer „real time“ RT-PCR. mRNA der hAEpC von zwei gesunden Spendern wurde an Tag 3, Tag 6 und Tag 8 der *in vitro* Kultur isoliert. Hier dargestellt sind die RAGE mRNA Expressionslevel, die auf die Expressionslevel des Haushaltsgens *GAPDH* normalisiert wurden. Die Mittelwerte von jeweils zwei unabhängigen Experimenten und die mittlere Standardabweichung der Einzelbestimmungen wurden dargestellt. Die konfokale Laserscanning Mikroskopie wurde dankenswerterweise von Dr. C. Ehrhardt (Abteilung für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie, Universität des Saarlands, Saarbrücken; jetzt: School of Pharmacy, University of Dublin, Trinity College, Dublin, Irland) durchgeführt.

3.14 KGF Behandlung der hAEpC

Auch die folgenden Experimente, bei denen frisch isolierte AT II Zellen in Gegenwart des Mitogens „keratinocyte growth factor“ (KGF) kultiviert wurden, unterstrichen die Eignung von RAGE als Marker für AT I Zellen (Abb. 23). Der Wachstumsfaktor KGF löst die Proliferation von AT II Zellen *in vivo* (Ulich et al. 1994) und *in vitro* (Panos et al. 1993) aus, wodurch KGF eine Rolle in der Reparatur des Alveolarepithels nach Lungenverletzung beigemessen wird (Mason et al. 1996). In kultivierten AT II Zellen wurde gezeigt, dass KGF den Phänotyp der AT II Zellen aufrecht erhält und die Transdifferenzierung in AT I Zellen inhibiert, bzw. diese in *in vitro* kultivierten Zellen rückgängig machen kann (Sugahara et al. 1995; Borok et al. 1998). Die Behandlung der hAEpC mit KGF führte zu einer vollständigen Unterdrückung der RAGE-Expression am Ende einer achttägigen Kultivierung (Abb. 23A a). Im Gegensatz dazu exprimierten die Zellen in der Abwesenheit von KGF RAGE sehr stark an der Oberfläche, wie Färbungen mit dem mAk 9A11 zu diesem späten Zeitpunkt demonstrierten (Abb. 23A b). Übereinstimmend mit der Aufrechterhaltung des AT II Status konnte SP-D in der Anwesenheit von KGF auch an Tag 8 noch nachgewiesen werden (Abb. 23A f), ohne KGF dagegen war die Produktion von SP-D vollständig eingestellt und nicht mehr zu detektieren (Abb. 23A e). Aquaporin-5 (AQP5), ein Wasserkanal, der auf der apikalen Oberfläche von AT I Zellen, nicht aber von AT II Zellen vorkommt (Borok et al. 1998), also als AT I Zell-Marker fungieren kann, wurde hoch exprimiert in den Zellen an Tag 8 ohne KGF-Behandlung gefunden (Abb. 23A c). KGF führte auch bei AQP5 zu einer starken Reduktion der Expression, wobei sie nicht vollständig blockiert wurde (Abb. 23A d).

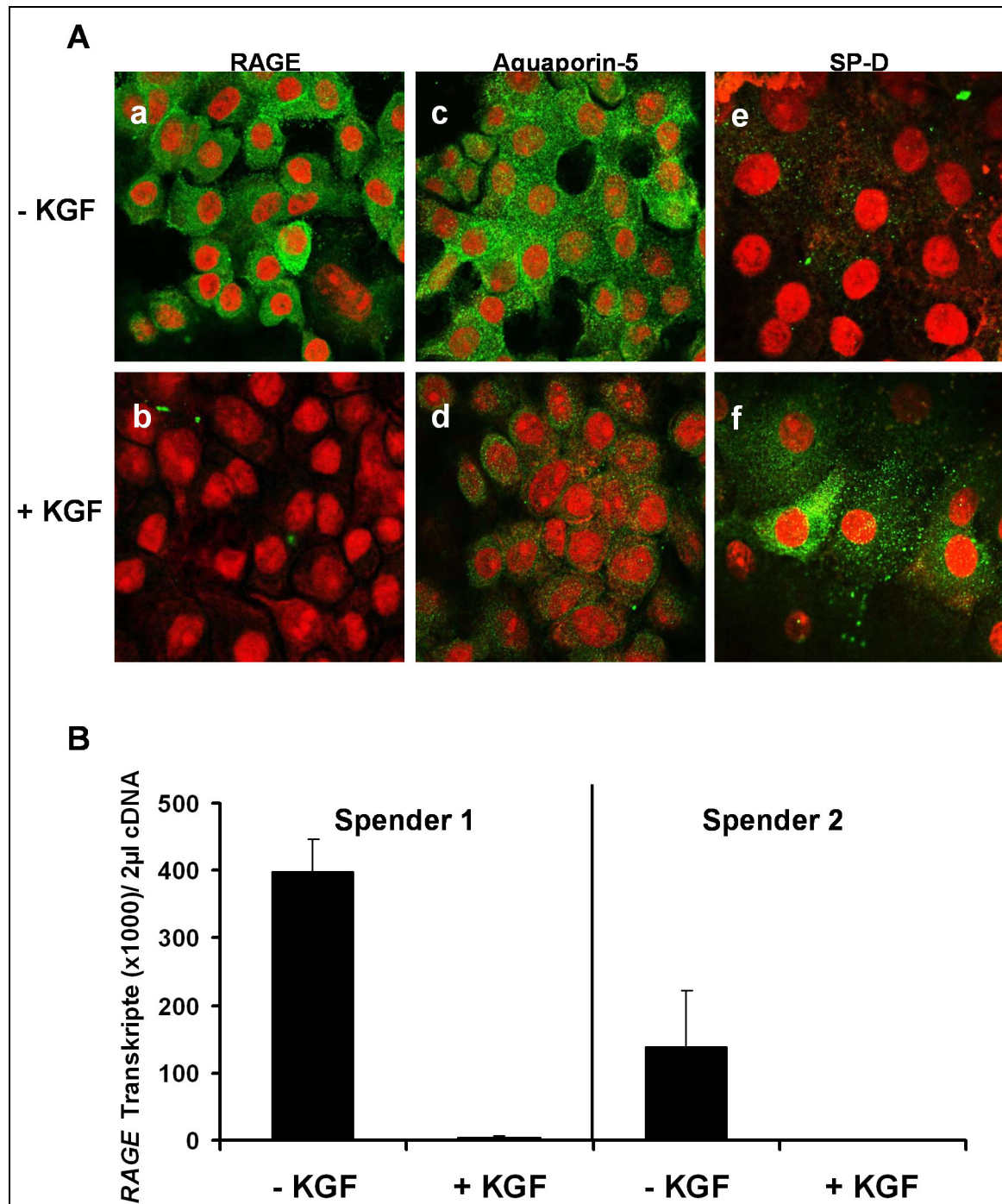


Abbildung 23. RAGE-Expression in hAEPc nach der Behandlung mit KGF. (A) Immunfluoreszenz-Analyse von RAGE (a, b) im Vergleich zum AT I Markerprotein Aquaporin-5 (c, d) und dem AT II Markerprotein SP-D (e, f) an Tag 8 der Kultur in Abwesenheit (a, c, e) oder Anwesenheit (b, d, f) von KGF. Die Immunreaktivität mit den entsprechenden Antikörpern ist als grüne Fluoreszenz dargestellt, die Zellkerne sind mit PI gegengefärbt (rote Fluoreszenz). (B) Vergleich der *RAGE* mRNA Expressionslevel in hAEPc von zwei Spendern an Tag 8 der Kultur mit oder ohne KGF-Behandlung mittels „real time“ RT PCR. Die Mittelwerte von jeweils zwei unabhängigen Experimenten nach der Normalisierung anhand des Haushaltsgens *GAPDH* und die mittlere Standardabweichung der Einzelbestimmungen wurden dargestellt. Die Mikroskopaufnahmen wurden wie in Abb. 23 von Dr. C. Ehrhardt durchgeführt.

Die durch KGF vermittelte negative Regulation der RAGE-Expression in isolierten Alveolarepithelzellen konnte auch auf Transkriptebene durch „real-time“ RT-PCR gezeigt werden (Abb. 23B). Die *RAGE*-Gentranskription wurde durch KGF fast komplett inhibiert, während die achttägige Kultivierung ohne KGF wie schon zuvor beobachtet wurde, in hAEpC von zwei Spendern eine Hochregulation der *RAGE*-Transkription hervorrief.

3.15 Subzelluläre Lokalisation von RAGE in hAEpC ermittelt durch Immunogold-Elektronenmikroskopie

Nachdem RAGE spezifisch in isolierten transdifferenzierten AT I Zellen über Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte, wurde nun auch die subzelluläre Lokalisation von RAGE in diesen Zellen in Immunogold-Elektronenmikroskopie Analysen untersucht (Abb. 24), da deren Ergebnis für die Planung von Funktionsanalysen von Bedeutung ist.

Die Färbungen der Lungenschnitte mit dem mAk 9A11 und LEA lieferten erste Hinweise, dass RAGE spezifisch an der basolateralen Membran der AT I Zellen exprimiert ist. Allerdings konnte nur eine relativ geringe Anzahl von Zellen analysiert werden, die so in der Ebene des Kerns geschnitten wurden, dass die apikale und basale Membran zu unterscheiden waren. Die Immunmarkierung der isolierten hAEpC mit Goldpartikeln an Tag 8, bzw. Tag 10 der Kultur mit mAk 9A11 oder 9G7 lieferte signifikante Signale, die sich von der Markierung mit normalem Mausserum, das als Kontrolle eingesetzt wurde, deutlich unterschieden. Die Goldpartikel waren in Regionen der basalen Membran der AT I-ähnlichen Zellen zu finden (Abb. 24A), wobei die Membran-Markierung diskontinuierlich auftrat und zum größten Teil fokal oder punktuell erschien (Abb. 24B). Einige der markierten Membranpunkte befanden sich in der Nähe von filamentösem Material, was nach Ansicht von Dr. M. Laue Intermediär-Filamente oder Mikrofilamente des Zytoskeletts darstellte (Abb. 24C). Diese Beobachtungen bekräftigten die in der Immunfluoreszenzanalyse von Lungenschnitten erhaltenen Daten. Weiterhin lieferten sie Hinweise, dass die *in vitro* kultivierten hAEp Primärzellen die Eigenschaften der Zellen in ihrer natürlichen Umgebung in der Lunge beibehalten.

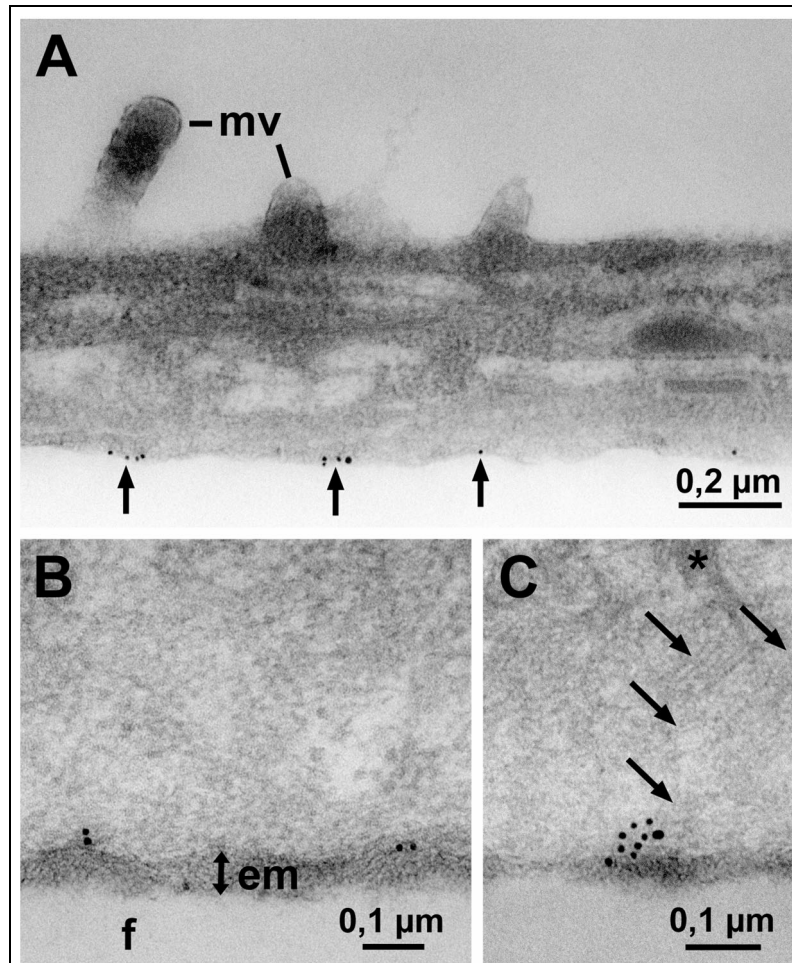


Abbildung 24. Immunogold-Elektronenmikroskopie der RAGE-Expression in hAEpC. Schnitte durch auf Filtern angewachsene AT I-ähnliche Zellen an Tag 10 (A), bzw. Tag 8 (B, C) in Kultur wurden mit dem anti-RAGE mAk 9A11 gefärbt. (A) Ein flacher Bereich der AT I-ähnlichen Zellen weist Goldpartikel an der basalen Plasmamembran (Pfeile) auf, nicht aber am apikalen Pol der Zelle, der durch Mikro villi (mv) gekennzeichnet ist. (B,C) Goldpartikel an der basalen Membran. (B) Die Markierung ist deutlich mit der basalen Membran assoziiert: Die Zellen haben eine extrazelluläre Matrix (em) sezerniert, die die Zellen von dem Filtersubstrat (f) trennt. (C) Einige der markierten Stellen sind in der Nähe von filamentösem Material lokalisiert (Pfeile). (*) Bündel von Zytoskelett-Filamenten. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. M. Laue (Zentrum für Elektronenmikroskopie, Medizinische Fakultät, Universität des Saarlands, Homburg) durchgeführt.

3.16 Beschleunigte Adhärenz von HEK293 fRAGE auf Kollagen IV-beschichteten Kulturschalen

Die interessante Beobachtung einer so starken und selektiven Expression von RAGE an der basolateralen Membran der AT I Zellen führte zu der Frage, welche physiologische Rolle RAGE in dieser Lokalisation ausübt. Der enge Kontakt der AT I Zellen mit der Alveolar-Basalmembran zusammen mit der Lektin-Domäne von RAGE deutete darauf hin, dass dieses Molekül an der Interaktion der Alveolarepithelzellen mit einer oder mehreren Komponenten der Basalmembran beteiligt sein könnte.

Diese Vermutung wurde mit Hilfe der HEK293 Zellen, die mit „full length“ RAGE transfiziert waren (pcDNA3.1-flRAGE) sowie mit mock-transfizierten, bzw. wt Zellen als Negativ-Kontrollen untersucht. Zu diesem Zweck wurden HEK293 flRAGE und HEK293 mock Zellen zunächst in 96-well-Platten eingesät, die mit humanem Kollagen IV, einer der Hauptkomponenten der Alveolar-Basalmembran, beschichtet waren (Abb. 25). Nicht-adhärenente Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur durch Waschen entfernt, anschließend wurde die Anzahl der haftenden Zellen quantitativ mit Hilfe des CCK-8 Reagenz bestimmt und auf die Anzahl der ursprünglich eingesäten Zellen bezogen. Wenn die Geschwindigkeit der Adhärenz so bestimmt wurde, zeigte sich, dass HEK293 flRAGE Zellen sich wesentlich schneller und in höherem Maße anhefteten als mock-transfizierte Zellen (Abb. 25A). RAGE-transfizierte Zellen wiesen nach 30 min eine maximale Adhärenzrate von 65 % auf, während mock-transfizierte Zellen eine maximale Rate von 40 % innerhalb dieses Zeitraums erreichten. Noch deutlicher trat das unterschiedliche Adhärenzverhalten zu früheren Kulturzeiten hervor: während schon nach 5 min eine Adhärenz von RAGE-transfizierten Zellen gemessen werden konnte, hefteten sich die ersten HEK293 mock Zellen erst nach 10 min an. Zu diesem Zeitpunkt stieg der Prozentsatz der HEK293 flRAGE Zellen schon auf ungefähr 30 % an. Nach 15 min blieb die Hälfte der eingesäten RAGE-transfizierten Zellen nach den Waschschritten angeheftet, aber nur weniger als ein Fünftel der mock-transfizierten Zellen überstand die Waschschrritte. Dies lässt darauf schließen, dass Membran-exprimierter RAGE effizient an der Adhärenz von Zellen an Kollagen-enthaltende Matrices beteiligt ist. Um die RAGE-Abhängigkeit dieser verstärkten Zelladhärenz zusätzlich zu beweisen, wurde das Adhärenz-Experiment in der Anwesenheit eines polyklonalen anti-RAGE-Ziegenerums, bzw. eines Ziege-Normalserums, sowie dem mAk 9A11 im Vergleich zu einer IgG1 Isotyp-Kontrolle durchgeführt (Abb. 25B). Hierfür wurden die Zellen für 20 min auf Eis mit den jeweiligen anti-RAGE-, bzw. Kontrollreagenzien vorinkubiert und in Anwesenheit dieser Reagenzien ausplattiert. Nach 13 min Inkubation wurden die Zellen wie oben gewaschen und der Prozentsatz der anhaftenden Zellen wurde bestimmt.

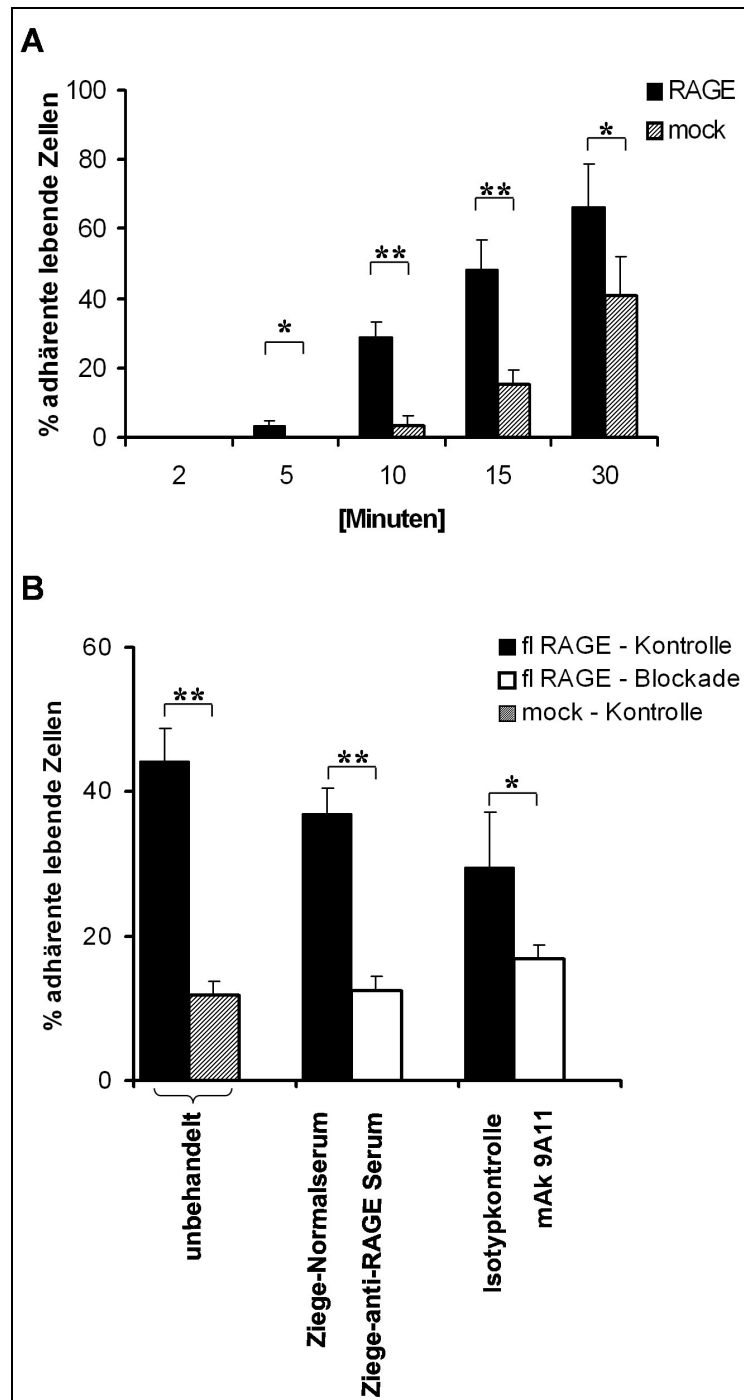


Abbildung 25. Untersuchung des Verhaltens von RAGE-exprimierenden Zellen auf Kollagen-beschichteten Oberflächen mit Hilfe von flRAGE-Transfektanten. (A) Die Rate der Adhärenz an Kollagen IV-beschichtete Vertiefungen von HEK293 flRAGE Zellen (schwarz) im Vergleich zu mock-transfizierten Zellen (schraffiert) wurde in einem Zeitkinetik-Experiment untersucht. Der Prozentsatz im Vergleich zu der ursprünglich ausplattierten Zellzahl ist angegeben. (B) Blockierungsstudien zeigen die RAGE-abhängige Adhärenz. Zellen wurden entweder unbehandelt eingesetzt (HEK293 flRAGE: schwarz; HEK293 mock: schraffiert), oder HEK293 flRAGE Zellen wurden mit einem polyklonalen Ziege-anti-RAGE Serum (schwarz) im Vergleich zu Ziege-Normalserum (weiß), bzw. mit dem gereinigten mAk 9A11 (weiß; 50 µg/ ml) im Vergleich zu einer IgG1 Isotypkontrolle (schwarz; 50 µg/ ml) vor dem Ausplattieren inkubiert. In (A) und (B) sind die Ergebnisse von Dreifachbestimmungen als Mittelwerte und die mittlere Standardabweichung der Einzelwerte dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des zweiseitigen Student-t-Tests ermittelt (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$). Je ein repräsentatives von drei durchgeführten Experimenten ist dargestellt.

Die Adhärenz der RAGE-Transfektanten wurde von 37 % in Anwesenheit des Ziege-Normalserums auf 12 % in Gegenwart des Ziege-anti-RAGE-Serums reduziert. Die Vorinkubation mit dem anti-RAGE mAk 9A11 verringerte die Rate der Adhärenz auf 16 % der ausplattierten Zellen, was der Hälfte der adhärenenten Zellen in Anwesenheit der Isotyp-Kontrolle entsprach. Unbehandelte Kontrollen der HEK293 flRAGE und HEK293 mock Zellen erreichten vergleichbare Adhärenzraten, von ungefähr 45 % bzw. 16 %, wie in dem Experiment zuvor, bei dem die Adhärenz in Abhängigkeit der Zeit untersucht wurde (Abb. 25A). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die verringerte Adhärenz in der Gegenwart von anti-RAGE-Reagenzien ähnlich der Adhärenzrate der mock-transfizierten Zellen ist, so dass man davon ausgehen kann, dass die RAGE-abhängige Adhärenz spezifisch inhibiert werden kann.

Diese Daten deuten stark darauf hin, dass eine Funktion von RAGE in der Verstärkung der Adhärenz von AT I Zellen an die Basalmembran besteht.

3.17 Ko-Kultur von RAGE-transduzierten Suspensionszellen mit NHLF

Normale humane Lungenfibroblasten (NHLF), die als Primärzelllinie erhältlich sind, produzieren Kollagen (Lee et al. 2001). Hier sollte nun das Verhalten stabil mit flRAGE transduzierter Suspensionszellen in Anwesenheit dieser Kollagen-produzierenden Zellen untersucht werden. Die Oberflächenexpression von RAGE in den humanen Suspensionszellen MOLT-4, Jurkat und THP-1 wurde mittels FACS nachgewiesen (Abb. 26A). Wenn NHLF zusammen mit flRAGE transduzierten (pcz-CGF.5.1-flRAGE-IRES-2EGFP), bzw. mock-transduzierten MOLT-4 Zellen kultiviert wurden, hefteten sich zunächst die adhärenenten NHLF an die Kulturschale und bildeten den für Fibroblasten typischen langgestreckten Phänotyp aus. 20 h nach dem Ausplattieren beider Zelltypen hafteten die RAGE-exprimierenden MOLT-4 Zellen stark an den NHLF (Abb. 26B a-c), während die mock-transduzierten Zellen gleichmäßig verteilt in Suspension blieben (Abb. 26C a-c). Besonders eindrucksvoll war dies bei einzeln liegenden NHLF zu beobachten, wobei die MOLT-4 flRAGE Zellen an den dünnen Ausläufern der NHLF wie an einer Schnur aufgereihte Perlen erschienen (Abb. 26B b und c). Das gleiche Verhalten zeigten auch die anderen Suspensionszelllinien Jurkat und THP-1 (nicht gezeigt), so dass diese Daten einen weiteren Hinweis auf die spezifische Interaktion von membranständigem RAGE mit dem Matrixprotein Kollagen lieferten.

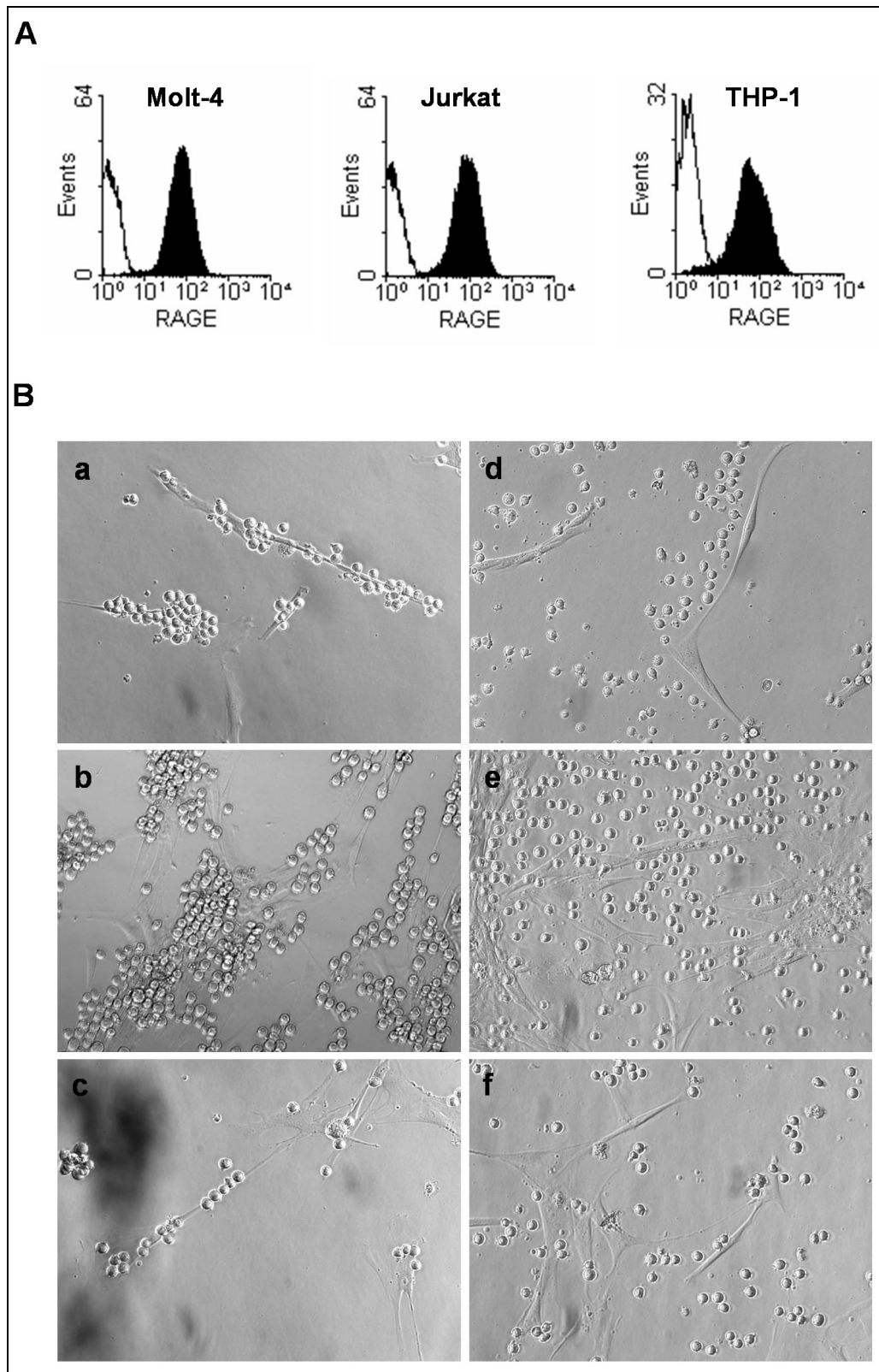


Abbildung 26. Adhärenz-Verhalten der fIRAGE-transduzierten Suspensionszellen. (A) Die Oberflächenexpression von RAGE der mit fIRAGE-transduzierten Suspensionszelllinien MOLT-4, Jurkat und THP-1 wurde mittels FACS unter Verwendung des mAk 9A11 untersucht (schwarze Kurve). Als Negativkontrollen wurden dieselben Zelllinien mit dem entsprechenden Leervektor transduziert (mock) und ebenfalls mit dem mAk 9A11 gefärbt (weiße Kurven). (B) Ko-Kultur von NHLF und fIRAGE-transduzierten MOLT-4 Zellen (a – c), bzw. mock-transduzierten MOLT-4 Zellen (d – f).

3.18 Interaktion von sRAGE mit Matrixproteinen

Da in Zellkultursystemen verschiedenste Moleküle in komplexen Vorgängen interagieren können, erscheint es schwierig, bestimmte Effekte gezielt einem Molekül zuzuschreiben. Für den spezifischen Nachweis der Bindung von RAGE an Kollagen wurden daher zusätzlich gereinigte Proteine in ELISA Untersuchungen eingesetzt.

ELISA-Platten wurden mit Kollagen oder Fibronectin, einem weiteren Matrixprotein, beschichtet. Anschließend wurde die Bindung des gereinigten sRAGE mit Hilfe des mAk 9A11 nachgewiesen (Abb. 27B). Als Negativkontrolle wurde anstelle von sRAGE, PBS eingesetzt, um eine mögliche unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an die Matrixkomponenten auszuschließen, was zu einem falsch-positiven Ergebnis führen würde. sRAGE bindet stärker an das immobilisierte Kollagen als an Fibronectin. Übereinstimmend damit konnte in dem umgekehrten Versuch auch eine wesentlich höhere Bindung von Kollagen an immobilisierten sRAGE im Vergleich zu Fibronectin gemessen werden (Abb. 27A).

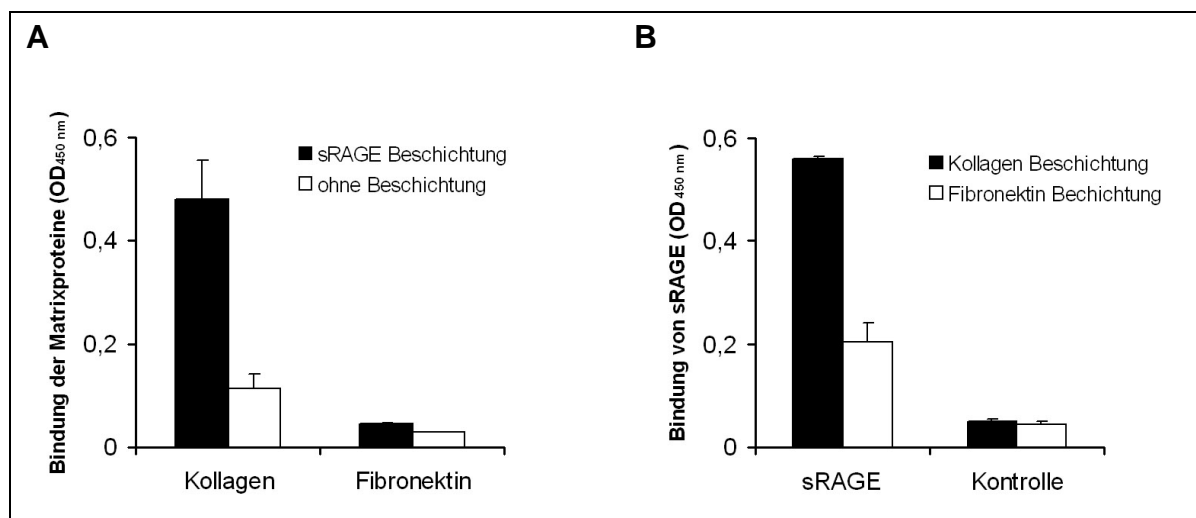


Abbildung 27. Interaktion von sRAGE mit Matrixkomponenten ermittelt durch ELISA. (A) Vertiefungen von Mikrotiterplatten wurden entweder mit 0,5 µg/ ml sRAGE (schwarz), bzw. PBS (weiß) als Negativkontrolle beschichtet. Dies diente dem Nachweis der spezifischen Bindung der Matrixkomponenten Kollagen, bzw. Fibronectin (je 10 µg/ ml) unter Verwendung von polyklonalen Kaninchen-anti-Kollagen-, bzw. Kaninchen-anti-Fibronectin-Antikörpern (1:100, bzw. 1: 14000; beide Chemicon) und HRP-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1: 7500; Chemicon). (B) Umgekehrter Versuchsansatz durch die Beschichtung der Vertiefungen mit 20 µg/ ml Kollagen (schwarz) oder Fibronectin (weiß) für den Nachweis Interaktion des gereinigten sRAGE-Proteins (10 µg/ ml) mit den Matrixkomponenten unter Verwendung des mAk 9A11 (unverdünnter Hybridomüberstand) und einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörpers (Dako, 1: 1000) zu untersuchen. Als Kontrolle wurde sRAGE durch PBS ersetzt.

Diese Daten bestätigen die vorherigen Beobachtungen der Interaktion von membranständigem RAGE mit Kollagen. Zusätzlich konnte eine gewisse Selektivität für Kollagen demonstriert werden, da keine spezifische Bindung von sRAGE mit einer anderen prominenten Matrixkomponente, Fibronectin, auftrat.

3.19 „Spreading“ von HEK293 flRAGE-Transfektanten auf Kollagen IV

Wenn HEK293-Transfektanten auf Kollagen-IV-beschichteten Deckgläschen ausplattiert und für einen längeren Zeitraum von 3 h inkubiert wurden, konnte die bemerkenswerte Beobachtung gemacht werden, dass die Expression von RAGE nicht nur die Geschwindigkeit der Adhärenz erhöhte, sondern auch in einem erheblichen Maß die Ausdehnung, das „Spreading“ der anhaftenden Zellen förderte (Abb. 28 a, b). Mock-transfizierte (Abb. 28e) oder wt HEK293 Zellen (Abb. 28f) zeigten nach der gleichen Inkubationsdauer dagegen noch einen kugelförmigen Phänotyp wie es für Suspensionszellen oder abgelöste Zellen typisch ist. Lediglich einige mock-transfizierte Zellen wiesen wenige kleine Zellfortsätze auf, die auf ein schwaches „Spreading“ hindeuteten. RAGE-exprimierende Zellen bildeten teilweise eine so flache Zellschicht, dass einzelne Zellen kaum zu differenzieren waren (Abb. 28b). Dieser dünne Phänotyp war nur noch mittels Interferenz-Mikroskopie detektierbar, während mock-transfizierte oder wt Zellen noch leicht mit einem Phasenkontrast-Mikroskop beobachtet werden konnten. Weder RAGE-transfizierte, noch mock-transfizierte oder wt Zellen waren in der Lage, an unbeschichtete Deckgläschen zu adhären. Aber auch die Beschichtung mit Fibronectin oder Laminin führte zu keiner effizienten Adhärenz und zu keinem „Spreading“, unabhängig von der Oberflächenexpression von RAGE (Abb. 28c, d). Dies weist wiederum auf eine spezifische Interaktion von RAGE mit Kollagen-Strukturen hin, wie es auch zuvor im ELISA demonstriert werden konnte.

Diese Fähigkeit von RAGE, das „Spreading“ von Zellen *in vitro* zu induzieren und zu verstärken, könnte auch die physiologische Funktion von RAGE *in vivo* in der Lunge repräsentieren. Dort müssen die RAGE-exprimierenden AT I Zellen diese ausgestreckte Morphologie entwickeln, um einen effektiven Gasaustausch zu gewährleisten und um gleichzeitig das großflächige Areal des Alveolarraums auszukleiden.

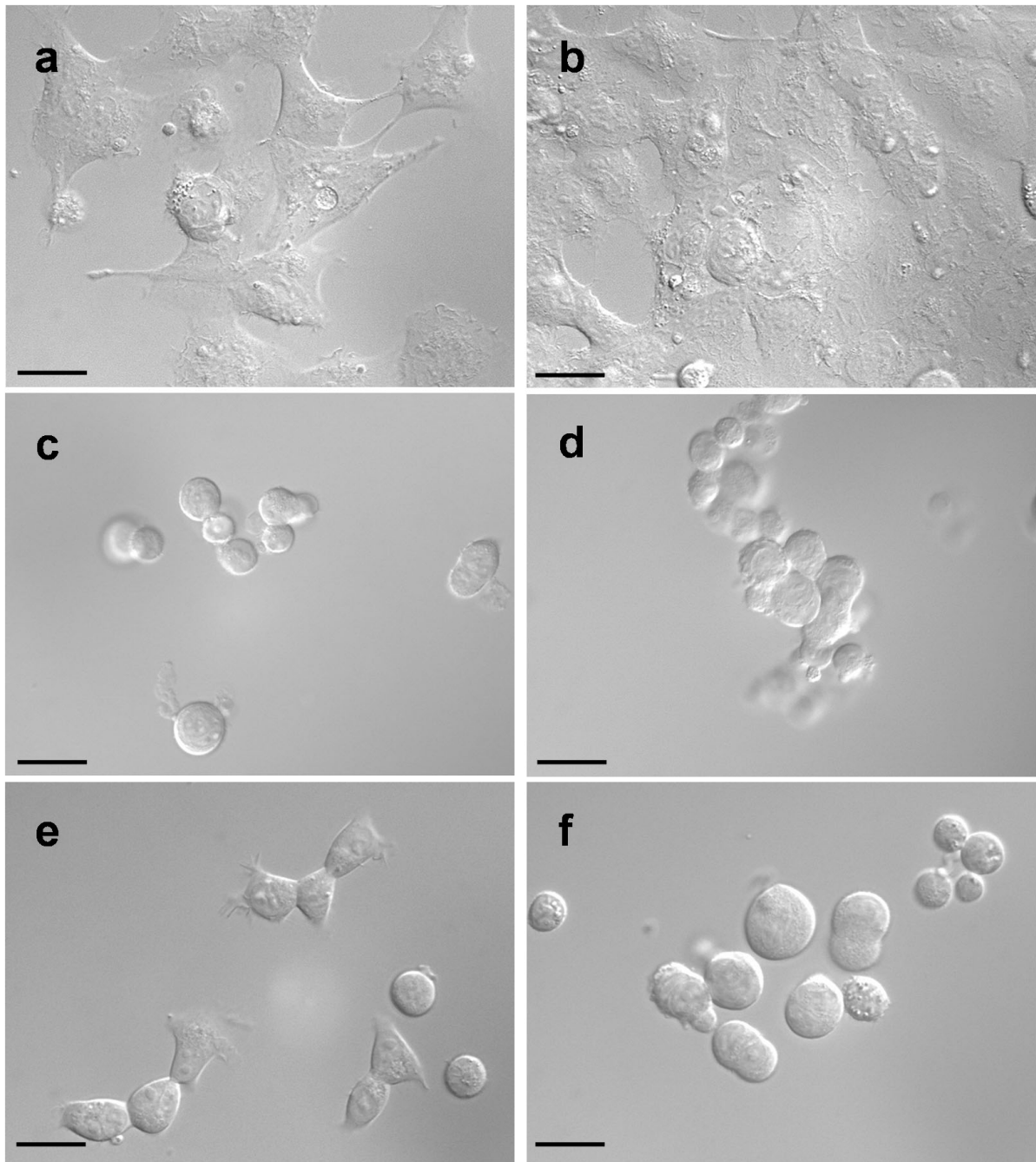


Abbildung 28. Expression von fIRAGE induziert Zell-„Spreading“. HEK293 Zellen, entweder transfiziert mit fIRAGE, mock-transfizierte oder untransfizierte wt Zellen, wurden auf unterschiedlich beschichtete Deckgläschen ausplattiert und für 3 h bei 37°C inkubiert, bevor sie lebend mittels Interferenz-Kontrastmikroskopie analysiert wurden. (a und b) HEK293 fIRAGE auf Kollagen IV-beschichteten Deckgläschen; (c) HEK293 fIRAGE auf Laminin- und (d) auf Fibronektin-beschichteten Deckgläschen; (e) HEK293 mock und (f) HEK293 wt Zellen auf Kollagen IV-beschichteten Deckgläschen.

Die Skalierungsbalken zeigen 30 µm an.

4 Diskussion

Diese Arbeit sollte zur Aufklärung der physiologischen Expression und Funktion von RAGE beitragen.

Hierfür wurden erfolgreich Werkzeuge generiert, mit denen die Funktion des Rezeptors RAGE außerhalb der vielfältig beschriebenen pathologischen Situationen analysiert werden konnte. Neben der Herstellung verschiedener RAGE-Konstrukte und deren Produkte für den Einsatz in Funktionsanalysen, dienten die drei hochspezifischen monoklonalen Antikörper, mit denen natives RAGE auf Zellen erkannt werden kann, der Untersuchung der Gewebe- und Zellverteilung von RAGE. Im Laufe der Untersuchungen wurde festgestellt, dass eine spezifische Interaktion von AGEs mit RAGE mit diesen Werkzeugen nicht nachzuweisen war. Des Weiteren erwies sich die in der Literatur beschriebene Lokalisation von RAGE auf verschiedenen Zellarten, insbesondere auf Endothelzellen in hochsensitiven Analysen als nicht nachvollziehbar. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass RAGE unter physiologischen Bedingungen präferentiell in Lungengewebe hoch exprimiert vorkommt. Umso überraschender ist die Tatsache, dass es keinerlei Erkenntnisse über eine mögliche physiologische Rolle von RAGE in der Lunge gibt. Nachdem im weiteren Verlauf dieser Arbeit die zelluläre und subzelluläre Lokalisation in der Lunge eindeutig geklärt wurde, konnten mit Hilfe der stabil mit flRAGE-transfizierten Zellen sowie dem sRAGE auch erste Hinweise auf eine potentielle Funktion von RAGE gewonnen werden, die über eine spezifische Interaktion mit Matrixkomponenten die funktionelle Morphologie von AT I Zellen zu gewährleisten scheint.

4.1 AGE-RAGE-Bindung

4.1.1 sRAGE

RAGE wurde ursprünglich aufgrund seiner Fähigkeit, AGE-modifizierte Produkte zu binden, identifiziert (Schmidt et al. 1992). Struktur-Funktionsanalysen haben gezeigt, dass die V-Domäne des Rezeptors verantwortlich für die Ligandenbindung ist, und dass der intrazytoplasmatische Teil eine essentielle Rolle für die RAGE-vermittelte intrazelluläre Signalweiterleitung spielt (Kislinger et al. 1999; Yan et al. 1994; Hofmann et al. 1999; Taguchi et al. 2000). Daher war es wichtig für Funktionsanalysen verschiedene RAGE-Konstrukte zur Verfügung zu haben. sRAGE

sollte unter anderem in Festphasenbindungsassays, flRAGE in Zellaktivierungsstudien eingesetzt werden.

Für die Expression des sRAGE wurden HEK293 Zellen, als ein humanes Zellsystem, gewählt, um zu gewährleisten, dass posttranslationale Modifikationen in möglichst nativer Form durchgeführt werden. Vor allem N-verknüpfte Glykosilierungen sind von Bedeutung, da gezeigt wurde, dass sich zwei N-Glykosilierungsstellen in der V-Domäne des Rezeptors befinden. Deren posttranslationale Modifikationen sollen an der Ligandenbindung beteiligt sein (Srikrishna et al. 2002). Die verwendeten HEK293 Zellen führten N-Glykosilierungen durch, wie mittels PNGase F-Behandlung des sRAGE bewiesen werden konnte. Bisher liegen keine Erkenntnisse über mögliche Unterschiede zu dem Glykosilierungsmuster des häufig in der Literatur beschriebenen Insektenzellsystems und dadurch bedingte Auswirkungen vor (Hori et al. 1995; Taguchi et al. 2000; Yan et al. 1996; Park et al. 1998; Schmidt et al. 1995a; Wautier et al. 1996). Weiterhin zeichnen sich die HEK293 Zellen durch die Expression von hohen Konzentrationen des Fremdproteins aus (Tate et al. 2003; Bulleid et al. 2000). Es konnte eine erfolgreiche Reinigungsstrategie für das Protein in nativer Form etabliert werden, mit Hilfe derer es möglich war, sRAGE in mg-Mengen aus dem Zellkulturüberstand der HEK293 Zellen zu gewinnen. Dieses in reiner Form gewonnene sRAGE-Protein diente unter Anderem für den Einsatz in Festphasenbindungsassays. Durch die Demonstration der spezifischen Bindung des gut charakterisierten Liganden S100B (Hofmann et al. 1999) konnte die Funktionalität des löslichen Rezeptors bewiesen werden. Des Weiteren wurde am Institut für Polymerforschung e.V. das gereinigte sRAGE erfolgreich an ein geeignetes Trägerpolymer gekoppelt. In ersten Funktionsanalysen konnte die folgende Bindung von anti-RAGE-Antikörpern über einen Schichtdickenzuwachs gemessen werden. Dies lieferte Hinweise auf die ausreichende Sensitivität und somit generelle Eignung dieses Systems als potentiellen „Biosensor“ für RAGE-Liganden.

4.1.2 AGE-Modifikationen

Die zu untersuchenden AGE-Liganden wurden von dem Projektpartner des Instituts für Lebensmittelchemie zur Verfügung gestellt. Der wichtigste Unterschied unserer Studie zu den zahlreichen Untersuchungen der AGE-RAGE-Interaktion bestand in der Tatsache, dass die hier verwendeten unterschiedlichen AGE-Modifikationen

genau definiert und reproduzierbar waren (vgl. Tabelle 4). Bis jetzt waren keine standardisierten Protokolle für die AGE-Herstellung und ebenso für die Charakterisierung verfügbar. Die Methoden wichen schon in Grundbedingungen wie Pufferzusammensetzung, Inkubationszeit und –temperatur voneinander ab: Die meisten Wissenschaftler setzten BSA als Ausgangsmaterial ein, das mit unterschiedlichen Konzentrationen von Glukose oder Glukose-6-Phosphat unterschiedlich lang (3-12 Wochen) bei variierenden Temperaturen inkubiert wurde (Makita et al. 1992; Yang et al. 1991; Schmidt et al. 1992; Yamagishi et al. 1997; Tanaka et al. 2000). So entstandene Produkte wurden generell als AGEs bezeichnet, wobei die Zusammensetzung und der Grad der Modifizierung nicht bekannt oder spezifiziert waren (Hui et al. 2001; Valencia et al. 2004c). Nachdem CML als bedeutendste Modifikation innerhalb der heterogenen Gruppe der AGEs *in vivo* identifiziert wurde (Kislinger et al. 1999), wurden Protokolle zur *in vitro* Herstellung durch Inkubation von verschiedenen Ausgangsproteinen mit Methylglyoxal entwickelt (Anderson et al. 1999). Auch hier wurden keine einheitlichen Methoden befolgt, so dass ein Vergleich der bisher erlangten Daten zur AGE-Rezeptor-Interaktion schwer möglich ist, und auch die Interpretation der Ergebnisse kritisch betrachtet werden muss.

4.1.3 Interaktion von sRAGE mit AGEs

Aus den oben genannten Gründen wurden für die Etablierung von Bindungsassays mit dem in HEK293 generierten sRAGE unterschiedlich stark derivatisierte CML-BSA, MG-BSA eingesetzt, die durch am Institut für Lebensmittelchemie entwickelte Methoden hergestellt und charakterisiert wurden (Henle 2001; Henle and Bachmann 1996; Sommer 2003). Weiterhin wurde ein kommerziell erhältliches, nicht definiertes, glykiertes BSA (Sigma) im Vergleich zum Ausgangs-BSA verwendet. Der Nachweis der modifizierten Proben erfolgte nicht wie in vielen beschriebenen Studien durch eine radioaktive Markierung (Miyata et al. 1996; Neeper et al. 1992; Schmidt et al. 1993; Schmidt et al. 1992), sondern durch eine Digoxigenin-Markierung in Verbindung mit einem anti-Digoxigenin-Antikörper. Dieses System stellt bei geringfügig niedrigerer Sensitivität gegenüber der radioaktiven Markierung eine kostengünstigere und weniger Gesundheits-gefährdende Alternative dar. In der ersten Durchführung des Versuchs konnte eine erhöhte Bindung von CML_{max} an immobilisiertes sRAGE im Vergleich zu den übrigen Proben gemessen werden, die

mit gleicher Stärke wie nicht-modifiziertes BSA banden. Von einer spezifischen Interaktion des CML_{max} mit sRAGE konnte dennoch nicht ausgegangen werden, da trotz identischer Blockierung eine noch höhere Bindung zu der unbeschichteten Oberfläche der Mikrotiterplatte bestand. Bei mehrfachen Wiederholungen dieses Experiments mit CML als Liganden konnten keine einheitlichen, reproduzierbaren Ergebnisse erreicht werden. In einem weiteren Versuchsansatz, bei dem sRAGE nicht an Plastikoberflächen immobilisiert wurde, sondern über den C-terminalen His₆-Tag an Nickelagarose gebunden wurde, sollte die Wahrscheinlichkeit für eine unspezifische Bindung der AGE-Proben infolge einer Denaturierung des sRAGE während des Beschichtens vermindert werden. Auch hier war kein Unterschied in der Bindung des nicht modifizierten BSA im Vergleich zu den modifizierten Proben zu erkennen. Um eine spezifische Bindung zu erreichen, wurden in dieser Arbeit die Bindungsstudien mit verschiedenen Modifikationen durchgeführt. Unter Anderem wurden neben BSA diverse Blockierungsreagenzien, wie z.B. Milchpulver eingesetzt, jedoch konnten dadurch keine anderen Ergebnisse erzielt werden. Darüber hinaus veranlasste die unspezifische Bindung der AGE-BSA-Proben an RAGE den Einsatz eines weiteren Ausgangsmoleküls, Lactoglobulin, für die Modifizierungen. Beim Einsatz in Bindungsexperimenten konnte zwar die unspezifische Bindung tatsächlich verringert werden, allerdings blieb auch eine Bindung an sRAGE weitestgehend aus (nicht gezeigt).

Bei den in der Literatur beschriebenen Experimenten wurde eine spezifische Bindung des ¹²⁵I-AGE an immobilisiertes RAGE meist durch die Reduktion der gebundenen Radioaktivität in Anwesenheit von unmarkiertem, „kaltem“ AGE im Überschuss bestimmt (Miyata et al. 1996; Neeper et al. 1992; Schmidt et al. 1992). In den Festphasenbindungsassays wurden jedoch selten die notwendigen Kontrollbestimmungen gezeigt. Wenn doch eine Titrierung des immobilisierten AGE-bindenden Proteins (aus bovinen Zellextrakten gewonnen, oder rekombinante Herstellung im Baculovirus-System) unternommen wurde, blieb der direkte Vergleich der Bindung von nicht-modifiziertem gegenüber modifizierten BSA größtenteils aus, so dass falsch-positive Ergebnisse nicht eindeutig ausgeschlossen werden können.

4.1.4 Bindung von AGEs an fIRAGE

Neben Bindungsassays mit dem gereinigten sRAGE-Protein, wurde auch die Bindung von AGEs an RAGE-exprimierende Zellen analysiert. Solche

Zellbindungsstudien wurden von anderen Gruppen bisher meist mit Endothelzellen durchgeführt. Es wurden jedoch auch weitere Zellen, wie z.B. mononukleäre Phagozyten auf ihre Fähigkeit, AGE-modifizierte Proteine über RAGE zu binden, untersucht (Esposito et al. 1989; Schmidt et al. 1993; Schmidt et al. 1992; Miyata et al. 1996). In diesen Studien wurde die Expression von RAGE meist nicht direkt nachgewiesen, so dass auch andere Oberflächenmoleküle, wie etwa Scavenger-Rezeptoren, an der Bindung beteiligt gewesen sein könnten. Dass die Bindung von RAGE abhängt, wurde aus der Blockade in Anwesenheit von sRAGE abgeleitet. Um reproduzierbare experimentelle Ausgangsbedingungen zu gewährleisten, wurde in der vorliegenden Arbeit ein artifizielles Zellkultursystem angewandt, bei dem HEK293 Zellen stabil mit fRAGE transfiziert wurden. Einerseits konnte damit eine hohe Expressionsdichte von RAGE auf der Zelloberfläche erreicht werden, zum Anderen konnte auf diese Weise die Bindung AGE-modifizierter Proben an RAGE-exprimierende Zellen direkt mit RAGE-negativen wt oder mock-transfizierten Zellen verglichen werden. Weder über eine Digoxigenin-Markierung noch über eine FITC-Markierung der AGEs, wie sie von Collison *et al.* beschrieben wurde (Collison et al. 2002), ließ sich eine spezifische Zelloberflächenbindung nachweisen. Um alle experimentellen Möglichkeiten auszuschöpfen, wurde eine radioaktive Markierung über Iodobeads (Pierce; Bonn, Deutschland) von BSA und CML-BSA durchgeführt und die Bindung der ¹²⁵I-markierten Proben an HEK293 fRAGE und HEK293 wt Zellen in einem Standard-Filterassay bestimmt (nicht gezeigt). Trotz der höheren Sensitivität im Vergleich zur DIG- oder FITC-Markierung wurde keine spezifische Bindung der CML-modifizierten Probe an HEK293 fRAGE Zellen gefunden. Beide Proben zeigten eine ähnliche Bindung sowohl zu HEK293 fRAGE als auch zu HEK293 wt Zellen.

4.1.5 AGE-bedingte Zellaktivierung

Die negativen Ergebnisse der Bindungsstudien korrelierten mit Befunden, die in den Untersuchungen zur NFκB-Aktivierung durch AGE-RAGE-Interaktion erhalten wurden. Die RAGE-transfizierten HEK293 Zellen wurden nur durch Inkubation mit TNFα, nicht aber mit AGE-BSA oder CML-BSA aktiviert. Es kann spekuliert werden, dass in diesem artifiziiellen Zellkultursystem eventuell benötigte Ko-Faktoren, die in nativ RAGE-exprimierenden Zellen vorhanden sein mögen, fehlen. Bis jetzt sind allerdings derartige Ko-Faktoren nicht bekannt. Der Befund von Schmidt *et al.*, dass

RAGE in einem Komplex mit einem Lactoferrin-ähnlichen Protein (LF-L) auftritt (Schmidt et al. 1994c) wurde von den Autoren nicht weiter verfolgt, nachdem kein Einfluss auf die Bindung von AGEs an RAGE durch LF-L festgestellt wurde.

Der Mechanismus der Zellaktivierung über NF κ B wird in diversen pathologischen Situationen, vor allem bei chronischen Krankheiten wie der Artherosklerose, der Amyloidose und dem Diabetes (Yan et al. 2000; Schmidt et al. 1999; Wautier et al. 1996; Abel et al. 1995) für die Verschlechterung des Gesundheitszustands verantwortlich gemacht, da die für die Homöostase der Zelle erwünschte rasche Inaktivierung von NF κ B bei der AGE-RAGE-vermittelten Induktion des NF κ B nicht stattfindet. Die resultierende, untypisch lang anhaltende Aktivierung des NF κ B soll letztendlich zu zellulärer Dysfunktion führen (Baeuerle and Henkel 1994; Bierhaus et al. 2001; Alkalay et al. 1995). Bei den von Bierhaus *et al.* beschriebenen NF κ B-Aktivierungsstudien wurden bovine Aorta-Endothelzellen nach der Stimulation mit modifiziertem BSA mittels EMSA untersucht. Die gemessene Aktivierung der Zellen, die auch noch nach sechs Tagen Inkubation demonstriert werden konnte, ließ sich in Anwesenheit von sRAGE unterdrücken, wodurch auch hier nur ein indirekter Nachweis der Abhängigkeit von RAGE erbracht wurde. Neben zahlreichen weiteren Studien, in denen NF κ B als Maß der AGE-RAGE-vermittelten Zellaktivierung gemessen wurde (Tanaka et al. 2000; Wautier et al. 1994; Kislinger et al. 1999), wurde in anderen Studien auch die Gentranskription bzw. folgende Proteinexpression als Konsequenz der NF κ B Translokation in den Kern untersucht. Die Hochregulation von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 (Schmidt et al. 1994a), und Gewebefaktor (TF) (Bierhaus et al. 1997; Esposito et al. 1989; Yamagishi et al. 1998), aber vor allem auch die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 (Boulanger et al. 2002; Schmidt et al. 1995a; Basta et al. 2002) deuteten auf eine Rolle von RAGE in der Endothelzell-Aktivierung hin und ließen ihn als wichtigen Entzündungsmediator erscheinen. Erwähnenswert ist jedoch, dass bei diesen Untersuchungen die RAGE-Abhängigkeit meist nur indirekt durch eine teilweise Blockade der Effekte in Gegenwart von sRAGE oder anti-RAGE-Reagenzien demonstriert wurde. Studien von Valencia *et al.* hingegen widerlegen den Befund der AGE-vermittelten VCAM-1 Expression in Endothelzellen (Valencia et al. 2004b). In weiteren Untersuchungen in *in vitro* und *in vivo* Modellen stellen die Autoren generell in Frage, dass die Bindung von AGEs an RAGE zu Zellaktivierung oder Entzündung führt, da bei der Verwendung von Endotoxin-freien AGE-Proben im

Gegensatz zu LPS-kontaminierten Proben, die als Kontrolle untersucht wurden, keine Aktivierung der Zellen festgestellt wurde (Valencia et al. 2004a). Der Befund, dass Endotoxin-freie AGE-Proben keinen Einfluss auf die Zellaktivierung haben, könnte auch die Ergebnisse der in dieser Arbeit dargestellten Experimente erklären, da die vom Institut für Lebensmittelchemie zur Verfügung gestellten Proben unter Endotoxin-freien Bedingungen hergestellt wurden.

4.1.6 Kritik an der AGE/ RAGE-Hypothese

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur AGE-RAGE-Interaktion begründen Zweifel an der Eignung des sRAGE für die Generierung eines Biosensors für AGEs, da noch nicht eindeutig geklärt ist, welche Bedeutung RAGE als spezifischem Rezeptor für AGEs zukommt. Neben Valencia *et al.* äußern andere Arbeitsgruppen ebenfalls, Schwierigkeiten zu haben, sowohl das RAGE-Protein in unterschiedlichen Zelltypen nachzuweisen, als auch die AGE-RAGE-vermittelte Induktion der Zellaktivierung zu zeigen (persönliche Mitteilung von Prof. A. Simm, Halle). Auch von Paul Thornalley wird die Rolle von RAGE als spezifischem Rezeptor für AGE, vor allem in Bezug auf die Alzheimer Krankheit kritisch diskutiert (Yan et al. 1996; Liu et al. 1997; Thornalley 2002a). Er hebt darauf ab, dass in den meisten Experimenten AGE-Protein-Liganden verwendet wurden, die viel höhere AGE-Derivatisierungen aufwiesen als *in vivo* vorkommende, und dass im Allgemeinen die AGE-Epitope und AGE-Protein-Liganden nicht charakterisiert wurden (Thornalley 1998). Schließlich gibt er zu bedenken, dass in manchen Fällen keine spezifische Bindung der AGE-Proteine gezeigt werden konnte (Shaw and Crabbe 1994).

Die Kritik an der AGE/ RAGE-Hypothese soll hier durch ein Zitat von Paul Thornalley zusammengefasst werden: „The AGE/ AGE receptor hypothesis has its critics and investigators planning to entry this field should be aware of them. Only by understanding the weaknesses of this hypothesis will we eventually be able to recognise its true worth.“ (Thornalley 2002b).

Es scheint notwendig, die physikochemischen Bedingungen für die AGE-Rezeptor-Bindung genauer verstehen zu lernen, um beurteilen zu können, ob RAGE in AGE-vermittelten pathologischen Zuständen überhaupt eine Rolle spielt (Valencia et al. 2004c). Das gilt natürlich auch für die Konzeption eines Biosensors für AGEs.

4.2 RAGE-Gewebeverteilung

Für RAGE wird eine ungewöhnlich breite Gewebe- und Zellverteilung beschrieben. Gerade in Bezug auf die diversen pathologischen Situationen, in denen RAGE eine wichtige Mediatorfunktion zugesprochen wird, ist es erstaunlich, dass der Rezeptor nicht während der Evolution eliminiert oder aber stark verändert wurde. Eine Erklärung könnte sein, dass RAGE-vermittelte Krankheiten vor allem chronischer Natur sind, die erst in höherem Alter auftreten (Simm et al. 2004). Unter physiologischen Bedingungen wird nur eine schwache Expression von RAGE beschrieben, pathologische Bedingungen, wie zum Beispiel die Ablagerung von AGEs im Gewebe bei Diabetes, die Anhäufung von Amyloid während der Alzheimer Krankheit und die dauerhafte Anwesenheit von S100/ Calgranulinen während chronischer Entzündungsreaktionen, sollen die Rezeptor-Expression erst induzieren (Schmidt et al. 2001). Eine Ausnahme stellt gesundes Lungengewebe dar, das in Untersuchungen von Brett *et al.* (1993) eine hohe Anzahl von *RAGE*-Transkripten aufwies. Bei den meisten – auch neueren – Studien bezieht man sich noch immer auf diese Beschreibung der RAGE-Gewebeverteilung, in der das RAGE-Protein mit Hilfe von polyklonalen anti-RAGE-Reagenzien nachgewiesen wurde und vor allem Endothelzellen zugeschrieben wurde (Brett et al. 1993). Nach wie vor werden hauptsächlich polyklonale anti-RAGE-Antikörper eingesetzt, was auf das Fehlen geeigneter monoklonaler Antikörper zurückzuführen ist (Hori et al. 1995; Renard et al. 1997; Schmidt et al. 1993; Wautier et al. 1996).

4.2.1 RAGE-Protein

In der vorliegenden Arbeit konnten drei hochspezifische monoklonale Antikörper generiert werden, die sich als besonders geeignet erwiesen, natives RAGE an der Oberfläche von Zellen nachzuweisen. Darüber hinaus erkennen sie RAGE auch in Lysaten von RAGE-exprimierenden Zellen bzw. Geweben und sRAGE im Western Blot sowie immobilisierten sRAGE im ELISA. Mit Hilfe dieser Antikörper, bzw. einem dieser Antikörper, mAk 9A11, der in den gezeigten Studien vorrangig eingesetzt wurde, konnte das RAGE-Protein direkt in Lysaten von normalem Lungengewebe mittels Western Blot detektiert werden. Im Gegensatz dazu konnte überraschenderweise in kultivierten Endothelzellen wie HUVEC und HMVEC-L, die allgemein als bevorzugtes Modell bei der Untersuchung von RAGE-vermittelten Dysfunktionen eingesetzt werden (Wautier et al. 1996; Schmidt et al. 1995a;

Hofmann et al. 1999; Boulanger et al. 2002), RAGE weder auf Transkript- noch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Dies traf auch dann zu, wenn die Zellen mit CML und IFN γ stimuliert wurden, Bedingungen, die die Hochregulation des Rezeptors über einen positiven Rückkoppelungsmechanismus bewirken sollen (Hudson et al. 2003; Kislinger et al. 1999; Tanaka et al. 2000). Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte die Tatsache liefern, dass die in diesen Modellen beobachteten Effekte häufig nur indirekt auf RAGE zurückgeführt werden konnten, zum Beispiel dadurch, dass eine Blockade in Anwesenheit von sRAGE erreicht wurde (Hudson et al. 2003; Stern et al. 2002; Wautier et al. 1996). Da RAGE in den unterschiedlichsten Zelltypen beschrieben wurde, wurden mit Hilfe des mAk 9A11 weitere frisch isolierte Zellarten, sowie Zelllinien in FACS-Analysen und im Western Blot untersucht. Unterschiedlich isolierte und kultivierte Monozyten, dendritische Zellen, aber auch T- und B-Lymphozyten sowie NK-Zellen (hier nicht gezeigt), kurz alle peripheren Blut-mononukleären Zellen (PBMC), sowie humane Zelllinien wie NHLF und L132 wurden hierbei als RAGE-negativ identifiziert. In der Arbeit nicht gezeigt sind die Untersuchungen von weiteren Zelllinien, wie die Monozyten-ähnlichen Linien U937 und THP-1, die von anderen Gruppen für die Untersuchung von RAGE-abhängigen Reaktionen eingesetzt wurden (Basta et al. 2002; Yeh et al. 2001) und hier ebenfalls RAGE-negativ waren. Die Diskrepanz zwischen den Befunden der RAGE-Verteilung könnte auf der Verwendung unterschiedlicher Nachweissysteme beruhen. Die Ergebnisse, die mit Hilfe der neu generierten monoklonalen Antikörper erhalten wurden, könnten noch durch Herstellung und Einsatz polyklonaler Seren, wie sie von anderen Gruppen verwendet werden, bestätigt werden. Teilweise wurde dies in Western Blot Untersuchungen bereits durchgeführt. Eine weitere Möglichkeit bietet die Untersuchung der *RAGE*-Transkripte in unterschiedlichen Zellen und Geweben, auch wenn keine zwingende Korrelation von Transkript- und Proteinmenge auftreten muss.

4.2.2 RAGE-Transkripte

Eine Bestätigung der bisherigen Daten lieferte die erste beschriebene quantitative Bestimmung der RAGE Transkripte in cDNAs aus 16 gesunden Geweben zusammengefasster Spender mittels der hochsensitiven quantitativen „real time“ RT-PCR-Methode. Damit wurden hohe Expressionslevel nur in Lungengewebe nachgewiesen, verglichen mit niedrigen und fast vernachlässigbaren Werten in allen

anderen analysierten Geweben und Zellen. Dieses Ergebnis widerspricht der Aussage, dass RAGE in einer Vielzahl von Geweben exprimiert wird und stellt die potentielle Relevanz der AGE-RAGE-Interaktion für die Beeinflussung der Gefäßeigenschaften, sowie für die Nerven- und Herzfunktion insbesondere während Diabetes aber auch des normalen Alterungsprozesses (Brett et al. 1993) erneut in Frage. Um mehr Erkenntnisse über die in der Literatur hervorgehobene Rolle von RAGE bei Entzündungsreaktionen zu gewinnen, wurden im Rahmen einer Kooperation mit PD Dr. H. Diepolder (Medizinische Klinik II, Klinikum Großhadern, LMU München) Proben aus entzündetem Darmgewebe von an M. Crohn erkrankten Patienten gesammelt, und die Expression von *RAGE* im Vergleich zu gesundem Gewebe derselben Spender untersucht. Bemerkenswerterweise wurde dabei im Gegensatz zu den Befunden anderer Gruppen (Thiele 2000) keine Korrelation in der Erhöhung der Expression mit entzündetem Gewebe festgestellt. Zusätzlich lieferten die Ergebnisse der Untersuchungen von HUVEC, die unter proinflammatorischen Bedingungen kultiviert wurden, weitere eindeutige Hinweise, dass der Befund einer erhöhten RAGE-Expression während Entzündungsreaktionen kritisch hinterfragt werden muss.

4.3 Zelluläre und subzelluläre Lokalisation von RAGE in der Lunge

4.3.1 Lungengefrierschnitte

Die hohe Expressionsstärke von RAGE in der Lunge wurde damit erklärt, dass sie ein Endothel-reiches Gewebe darstellt (Schmidt et al. 1992). Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit durch Einsatz der neuen monoklonalen anti-RAGE-Antikörper zusammen mit weiteren Zelltyp-spezifischen Markerantikörpern (Kasper and Singh 1995) die RAGE-Expression selektiv auf den terminal differenzierten AT I Zellen in humanen Lungen-Gefrierschnitten gezeigt werden. Dieser Befund bestätigt indirekt die negativen Befunde der RAGE-Expression in HUVEC und HMVEC-L. Von anderen Gruppen wurde eine identische Lokalisation vor allem in Lungengewebe von Ratten beschrieben (Fehrenbach et al. 1998; Shirasawa et al. 2004). In diesen Studien wurden polyklonale anti-RAGE-Seren verwendet, um das RAGE-Protein zu detektieren. In einer weiteren Studie wurden mittels Gen-Chip-Analysen differentiell exprimierte Gene in AT I und AT II Zellen identifiziert, wobei unter Anderem RAGE AT I Zellen zugeordnet werden konnte (Dahlin et al. 2004). Im Gegensatz dazu

wurden in einer früheren Studie *RAGE*-Transkripte mittels *in situ* Hybridisierung, bzw. mittels RNA Blot-Analysen in isolierten Rattenzellen nur in AT II, nicht aber in AT I Zellen detektiert (Katsuoka et al. 1997). Obwohl die Isolation und *in vitro* Kultivierung von AT II Zellen unter bestimmten Bedingungen zu Zelltransformation führen, was in veränderten Expressionsmustern resultieren kann (Danto et al. 1995; Ehrhardt et al. 2004), lässt sich diese Diskrepanz der *RAGE*-Lokalisation nicht eindeutig klären.

4.3.2 Isolierte hAEpC

In dieser Arbeit erwies sich das etablierte, humane *in vitro* Transdifferenzierungs-Modell (Elbert et al. 1999; Fuchs et al. 2003) als besonders geeignet, um die Expression von *RAGE* in den unterschiedlichen Zelltypen AT I und AT II zu verfolgen und die Ergebnisse der Färbungen der Lungenschnitte zu bestätigen. Weder auf mRNA-Ebene mit Hilfe von quantitativer „real time“ RT-PCR, noch auf Protein-Ebene durch Einsatz spezifischer monoklonaler Antikörper wurde *RAGE* in AT II Zellen gefunden. Dagegen stieg die Expressionsrate mit fortschreitender Kulturdauer und einhergehender Differenzierung stetig an. Diese Steigerung resultierte in einer höheren Expression von *RAGE* im Vergleich zu anderen untersuchten AT-I-Markerproteinen. Auffallend war auch, dass die *RAGE*-Expression in Anwesenheit von KGF, das die Transdifferenzierung verhindert, sogar noch stärker als der AT I-Marker Aquaporin-5 (Borok et al. 1998) inhibiert wurde.

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wird darauf hingewiesen, dass die *in vitro* kultivierten Zellen sich von frisch isolierten AT I Zellen unterscheiden, so dass die Interpretation der AT I-ähnlichen Zellen kritisch betrachtet werden sollte (Gonzalez et al. 2005). Allerdings wurde in dieser Untersuchung außer Acht gelassen, dass auch die Isolierungsprozedur zu Veränderungen der Gen- bzw. Protein-Expression führen kann, so dass auch die in dieser Studie untersuchten, frisch isolierte AT I Zellen sich von den Zellen im Gewebeverband unterscheiden können. Die Aussage, dass frisch isolierte und kultivierte Zellen verschiedene Phänotypen aufweisen, liefert also keinen Hinweis darauf, dass das *in vitro* Kultivierungsmodell der hAEpC ungeeignet für die Charakterisierung von AT I Zellen ist. In der hier dargestellten Studie korrelierten die Ergebnisse der *in vitro* kultivierten Zellen mit den Immunfärbungen der Lungenschnitte, so dass die Interpretation als AT I-ähnliche Zellen als durchaus zutreffend angesehen werden kann. Da *RAGE* auf keinen anderen Zellen oder in anderen gesunden Geweben gefunden wurde, konnte es hier als hoch spezifischer

Marker für humane AT I Zellen etabliert werden. Darüber hinaus konnte RAGE mittels Doppel-Immunfluoreszenz-Färbungen der Lungengefrierschnitte mit dem mAk 9A11 und LEA und mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie von kultivierten AT I-ähnlichen Zellen selektiv an der basolateralen Membran der AT I Zellen lokalisiert werden. Dieser Befund ist besonders wertvoll, da die wenigen bisher bekannten Marker für AT I Zellen hauptsächlich apikal vorkommen (Williams 2003). Außerdem lieferte er einen wichtigen Hinweis für die Konzeption gezielter Analysen zur Klärung der Funktion von RAGE in den spezialisierten AT I Zellen.

4.4 Mögliche physiologische Funktionen von RAGE in der Lunge

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen vielfältigen pathologischen Situationen, in denen RAGE eine entscheidende Rolle zugesprochen wurde, lässt die hohe und selektive Expression von RAGE in AT I Zellen, die auch ohne erkennbaren Stimulus vorhanden ist, eine physiologische Funktion von RAGE an dieser Stelle vermuten. Verschiedene Möglichkeiten wurden in Erwägung gezogen und teilweise untersucht:

4.4.1 Signaltransduktion

RAGE wurde als Signaltransduktionsrezeptor beschrieben (Bierhaus et al. 2001; Kislinger et al. 1999). Während pathophysiologisch relevante Liganden wie AGEs und β -Amyloid durch die Bindung an RAGE zellulären oxidativen Stress auslösen sollen, der schließlich die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und dadurch bedingte Gentranskription bewirkt (Yan et al. 1996; Yan et al. 1994), führt die Interaktion von Amphoterin mit RAGE unabhängig von NF κ B zu Neuriten-Wachstum (Huttunen et al. 1999; Srikrishna et al. 2002). Je nachdem welcher Ligand an RAGE bindet, werden auf noch unbekannte Weise unterschiedliche vorgeschaltete Signalwege ausgelöst. Die Induktion von oxidativem Stress führt zur Aktivierung eines Ras-MAP-Kinase-Weges. Die kleinen GTPasen Rac und Cdc42 der Rho Familie sind dagegen in das Neuriten-Wachstum involviert (Hall 1998). Yeh et al. konnten die Abhängigkeit von p38 und p44/42 Mitogen-aktivierten-Kinasen (MAP-Kinasen) in der RAGE-vermittelten NF κ B-Aktivierung und Zytokin-Sekretion in einer Monozyten Zelllinie demonstrieren (Yeh et al. 2001). Aber auch in glatten Muskelzellen (Satoh et al. 1997), in Ratten PC12 Zellen (Lander et al. 1997), in kultivierten Nierenzellen (Simm et al. 1997), in Osteoblasten (Cortizo et al. 2003) und in Endothelzellen (Kislinger et al. 1999) wurde eine MAP-Kinase-Aktivierung (p44/42)

durch RAGE-Liganden nachgewiesen. Dies zeigt, dass dieser Signalweg nicht auf einen bestimmten Zelltyp beschränkt ist. Obwohl keine bekannten Signalmotive oder Konsensus-Kinasemotive vorhanden sind, benötigen überraschenderweise alle durch RAGE ausgelösten Signalwege in einem ungeklärten Mechanismus den intrazytoplasmatischen Anteil des Rezeptors. Bei Fehlen dieser Sequenz, z.B. bei der dominant-negativen (DN) RAGE-Mutante, wurde gezeigt, dass keine Signalweiterleitung mehr erfolgt (Hofmann et al. 1999). Diese Befunde lassen vermuten, dass RAGE selbst nicht die Signaltransduktion vermittelt. Wahrscheinlicher ist eine Assoziation des Rezeptors mit Signaltransduktionsmolekülen in der Zellmembran.

Bei vielen Transmembranrezeptoren der Immunglobulinklasse wird die Signalweiterleitung durch eine Quervernetzung nach Ligandenbindung initiiert (Santana et al. 1996; Sanchez-Mejorada and Rosales 1998). Um die Rolle von RAGE als Signalrezeptor zu untersuchen, wurde hier die Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen nach der Quervernetzung mit Hilfe der monoklonalen Antikörper in RAGE-transfizierten HEK293 Zellen analysiert. Weder p38 (nicht gezeigt) noch p44/42 wurden in diesen Zellen durch monoklonale anti-RAGE-Antikörper effizient aktiviert. Dieses Ergebnis zusammen mit den EMSA- und ELISA-Untersuchungen, bei denen die NF κ B-Aktivierung in HEK293 fRAGE Zellen nach Inkubation mit AGE-modifizierten Proben analysiert wurden, stellen in Frage, dass die Signalweiterleitung eine entscheidende Funktion von RAGE darstellt. Zweifel daran werden weiterhin durch die Studien von Valencia *et al.*, die lediglich durch Endotoxin-kontaminierte AGE-Proben eine NF κ B-Aktivierung nachweisen konnten (Valencia et al. 2004a), sowie durch das Fehlen bekannter Signalmotive im intrazytoplasmatischen Anteil des Rezeptors bekräftigt.

4.4.2 Transport

Das Alveolarepithel besteht aus den beiden spezialisierten Zelltypen AT I und AT II und bildet die Hauptschranke für die Absorption von Makromolekülen aus der Atemluft bzw. der Alveolarflüssigkeit in die pulmonale Zirkulation (Taylor and Gaar, Jr. 1970; Normand et al. 1971). Funktionen der AT II Zellen, wie z.B. die Synthese von Surfactantfaktoren und anderen Proteinen, die Fähigkeit zu proliferieren und weitere biologische Funktionen, sind vielfältig beschrieben. Im Gegensatz dazu blieb die Funktion von AT I Zellen, außer ihrer Barrierefunktion, bei biologischen

Prozessen lange Zeit unklar, da eine umfassende Charakterisierung dieser Zellen am Fehlen eindeutiger Marker scheiterte (Williams 2003). So wurden die AT I Zellen als Alveolen-auskleidende Zellen dargestellt, deren Hauptaufgabe darin besteht, eine Barriere von minimaler Dicke zu liefern, die gut durchlässig für Gase ist (Junqueira L. 2002). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass AT I Zellen an verschiedenen Transportprozessen von Flüssigkeiten und Molekülen beteiligt sind. Sie weisen die höchste Wasserpermeabilität aller Säugerzellen auf (Dobbs et al. 1998), wobei die Rolle des Wasserkanals Aquaporin-5, der in AT I Zellen, nicht aber in AT II Zellen exprimiert wird, noch nicht vollständig geklärt ist (Borok et al. 1998; Ma et al. 1999). Außerdem besitzen die Zellen Na^+ , K^+ -ATPase Aktivität und exprimieren den epithelialen Natriumkanal (ENaC) (Johnson et al. 2002; Ridge et al. 1997). Diese Eigenschaften prädestinieren die AT I Zellen für die Regulation des Volumens, der Zusammensetzung und der Entfernung der Alveolar-Flüssigkeit. Dass die AT I Zellen nicht nur eine passive Schranke bilden, zeigt auch das Vorhandensein von Caveolae und des zugehörigen Proteins Caveolin-1 in AT I Zellen, nicht aber in AT II Zellen (Newman et al. 1999; Fuchs et al. 2003). Zu den für Caveolae beschriebenen Funktionen gehören die Internalisierung von kleinen Molekülen oder Ionen (Anderson et al. 1992), der intrazelluläre Transport (Fielding and Fielding 1996) sowie die Vesikelbildung für die Endocytose oder Transcytose von Makromolekülen (Schnitzer et al. 1994). Weitere Proteintransport-Mechanismen der AT I Zellen wurden von Kim und Malik in einem Review zusammengefasst (Kim and Malik 2003), aus dem deutlich hervorgeht, dass AT I Zellen weit mehr Funktionen ausüben als ursprünglich angenommen, und dass diese Funktionen absolut notwendig sind, um die Alveolar-Homöostase aufrecht zu erhalten, bzw. diese nach Lungenverletzungen möglichst schnell wieder herzustellen.

Die meisten beschriebenen Transport-Prozesse laufen von der apikalen zur basolateralen Seite dieser polarisierten Epithelzellen ab. In dieser Arbeit sollte unter Anderem untersucht werden, ob RAGE, das selektiv an der basolateralen Membran der AT I Zellen lokalisiert wurde, an Transportprozessen von der basalen zur apikalen Seite beteiligt ist. Der Multiliganden-Rezeptor RAGE könnte am Transport einer Vielzahl möglicher Moleküle von der basolateralen Membran der AT I Zellen in den Alveolarraum beteiligt sein. Der RAGE-Ligand Amphoterin wurde z.B. in Lungengewebe detektiert (Abraham et al. 2000; Wang et al. 1999), während AGE-modifizierte Proteine hier eine untergeordnete Rolle spielen (Schleicher et al. 1997).

In „pulse chase“-Experimenten (nicht gezeigt) wurde allerdings nach Quervernetzung des Membran-exprimierten Rezeptors in HEK293 flRAGE Zellen mit Hilfe der monoklonalen anti-RAGE-Antikörper keine Rezeptor-Internalisierung beobachtet, so dass bisher keine Hinweise auf eine mögliche Transportfunktion von RAGE erlangt werden konnten. Dies stimmt mit Untersuchungen überein, die zeigen, dass RAGE nicht als Scavenger-Rezeptor fungiert und somit nicht an der Aufnahme und dem möglichen transzellulären Transport von Liganden beteiligt ist (Schmidt et al. 2001).

4.4.3 Adhäsion von immunregulatorischen Zellen

RAGE wird eine Schlüsselrolle in Entzündungsprozessen zugesprochen (Schmidt et al. 2001). Die Rekrutierung von Leukozyten ist ein integraler Teil solcher Prozesse und beinhaltet mehrere Stufen von Adhäsions- und Signalereignissen, wie unter anderem das Selektin-vermittelte Rollen, die Leukozyten-Aktivierung und die Integrin-vermittelte starke Adhäsion und schließlich die Diapedese der Leukozyten am Entzündungsort (Springer 1994). Der genaue Mechanismus der transendothelialen Migration ist allerdings noch nicht vollständig geklärt (Aurrand-Lions et al. 2002). In einer Studie von Chavakis *et al.* wurde ein direkter Zusammenhang von RAGE und Leukozyten-Rekrutierung aufgedeckt, indem eine spezifische Interaktion von RAGE mit dem Leukozyten- β 2-Integrin Mac-1 nachgewiesen werden konnte (Chavakis et al. 2003). RAGE soll neben dem klassischen Adhäsionsmolekül ICAM-1 (Carlos and Harlan 1994; Sligh, Jr. et al. 1993) als Gegenrezeptor für Integrine dienen, und so die Rekrutierung von Leukozyten bewirken. Dies ist vor allem in Stresssituationen oder bei pathologischen Bedingungen wie Diabetes von Bedeutung, also in Situationen, in denen die Expression von RAGE als erhöht beschrieben wurde (Schmidt et al. 2001). In anderen Studien wurde gezeigt, dass Amphoterin RAGE-vermittelt die Migration von glatten Muskelzellen (Degryse et al. 2001), aber auch von Monozyten (Rouhiainen et al. 2004) auslösen kann. Amphoterin tritt auch in der Lunge auf (Wang et al. 1999; Abraham et al. 2000), so dass man eine Rolle für RAGE als Zellrekrutierungsrezeptor vermuten könnte, der Amphoterin-abhängig die Transmigration von Immunzellen in den Alveolarraum bewirkt, um eingeatmete Pathogene zu bekämpfen. Bis jetzt ist, im Gegensatz zu der Integrin-abhängigen Transmigration durch das Endothel, der Mechanismus der Emigration von Monozyten in den Alveolarraum durch das Epithel kaum verstanden (Rosseau et al. 2000). Alveolarepithelzellen könnten die gerichteten Leukozyten-Wanderung durch

differenzielle Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1, das von AT I und AT II Zellen exprimiert wird (Cunningham and Kirby 1995) und durch Chemokin-Sekretion (Liu et al. 1996) beeinflussen. Ob RAGE auch hier wie oben beschrieben als Rezeptor für Leukozyten-Integrine eine Rolle spielt, und somit an Immunreaktionen in der Lunge beteiligt ist, wurde noch nicht untersucht. Eine Möglichkeit bieten Migrationsexperimente mit isolierten, transdifferenzierten AT I-ähnlichen Zellen und Leukozyten in Transwell-Kammern. Für die Etablierung des Systems könnte man zunächst die transfizierten HEK293 flRAGE Zellen einsetzen, da diese unbegrenzt zur Verfügung stehen und leichter zu kultivieren sind. Ein weiterer Vorteil dieser Zellen liegt in der schon beschriebenen Möglichkeit, HEK293 wt oder mock transfizierte Zellen als Negativ-Kontrolle einzusetzen und somit direkt Hinweise auf die RAGE-Abhängigkeit erhalten zu können.

4.4.4 Adhärenz und „Spreading“

Auch wenn die hier beschriebenen möglichen Funktionen von RAGE nicht vollständig ausgeschlossen werden können, legt die hier gezeigte selektive Expression von RAGE an der basolateralen Membran der lang gestreckten AT I Zellen die Vermutung nahe, dass die Interaktion mit einer oder mehreren Komponenten der Alveolarbasalmembran eine Hauptaufgabe von RAGE ist. Die Basalmembran ist eine dünne Schicht der extrazellulären Matrix (ECM). Sie übt auf der einen Seite eine Barrierefunktion aus, auf der anderen Seite dient sie als Substrat, an das Zellen adhärieren können. Interaktionen zwischen Epithelzellen und Komponenten der Basalmembran beeinflussen zelluläre Funktionen wie Migration, Proliferation und Differenzierung (Crouch EC 1996; Paulsson 1992). Die Hauptkomponenten der Alveolar-Basalmembran bilden Kollagen IV, Laminin, Fibronectin, Perlecan und Entactin (Yurchenco and O'Rear 1994; Timpl 1989; Dunsmore et al. 1995; Laurie et al. 1982), die teilweise von mesenchymalen Zellen sowie von epithelialen Zellen synthetisiert werden (Burgeson et al. 1994; Hudson et al. 1993; Ekblom et al. 1994). Im Bereich der Blut-Luft-Schranke zwischen Alveolarepithelzellen Typ I und Kapillarendothelzellen der Lungenbläschen verschmelzen die Basalmembranen der beiden Zelltypen zu einer gemeinsamen, dünnen Basalmembran, um den Gasaustausch zu erleichtern. Neben einer speziellen Zusammensetzung der Basalmembran im Bereich der Blut-Luft-Schranke – die Basalmembrandomänen unterhalb der AT I und AT II Zellen weisen strukturelle

Unterschiede auf - (Sannes 1984), ist anzunehmen, dass auch spezifische Oberflächenmoleküle auf den AT I Zellen benötigt werden, die eine starke Adhärenz für das Erreichen des außergewöhnlich dünnen, ausgedehnten Phänotyps bewirken. Im Rahmen dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass membranständiges RAGE die Adhärenz von Zellen an Matrixproteine verstärkt und vor allem die besondere Fähigkeit besitzt, „Spreading“ von Zellen auszulösen. HEK293 flRAGE Zellen adhärten nicht nur schneller an Kollagen IV-beschichtete Oberflächen als mock-transfizierte oder untransfizierte Zellen, sondern sie entwickelten einen derart flachen Phänotyp, dass er im Phasenkontrast nicht mehr zu detektieren war und nur mit Hilfe der Interferenzkontrast-Mikroskopie beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu adhärten die mock-transfizierten und Wildtyp-Zellen unter gleichen Kulturbedingungen kaum und blieben kugelförmig.

Die spezifische Beteiligung von RAGE an Adhärenzvorgängen konnte in verschiedenen weiteren Experimenten gezeigt werden. Zum einen reduzierten polyklonale und monoklonale RAGE-spezifische Antikörper maßgeblich die Geschwindigkeit, mit der RAGE-transfizierte Zellen an Kollagen IV-beschichtete Substrate adhärten, zum Anderen konnte eine spezifische Interaktion von RAGE-transduzierten Suspensionszellen an Kollagen-produzierende normale humane Lungenfibroblasten (NHLF) beobachtet werden. Erwähnenswert ist, dass diese Suspensionszellen nicht zur Adhärenz auf Kollagen-beschichteten Oberflächen gebracht werden konnten. Die Adhärenz von Zellen beinhaltet sehr komplexe Vorgänge, und es sind diverse Moleküle involviert. Daher ist es nicht verwunderlich, dass ein einziges Molekülpaar, in diesem Fall RAGE/ Kollagen, nicht ausreicht, um Zellen, die von Natur aus in Suspension verbleiben, an eine Matrix anzuheften. In der Ko-Kultur mit NHLF können neben der RAGE-Kollagen-Bindung Interaktionen zwischen weiteren Oberflächenmolekülen wie zum Beispiel Integrinen stattfinden, die den Zell-Zell-Kontakt stärken. Trotzdem muss RAGE eine Schlüsselrolle zugesprochen werden, da RAGE-negative Suspensionszellen nicht in der Lage waren, einen solchen Zell-Zell-Kontakt mit NHLF einzugehen. RAGE wurde neben seiner ursprünglich entdeckten Eigenschaft, AGEs zu binden (Neeper et al. 1992; Schmidt et al. 1992), als „Pattern-Recognition“-Rezeptor charakterisiert, der eher die dreidimensionale Molekülkonformation eines Liganden, wie β -Faltblatt-Strukturen oder Fibrillenformationen als eine spezifische Aminosäure-Sequenz erkennt (Schmidt et al. 2001). Das stimmt mit dem hier dargestellten Befund überein, dass die

Induktion des „Spreading“ der HEK293 flRAGE Zellen auf Deckgläschen vollständig von der Beschichtung mit Kollagen abhing, das dreidimensionale Fibrillennetzwerke bildet (Nagai et al. 2000; Timpl et al. 1981). Dass es sich dabei um eine selektive Interaktion mit Kollagen und nicht allgemein mit Matrixkomponenten handelt, zeigt weiterhin die spezifische Bindung von sRAGE an Kollagen nicht aber an Fibronectin und umgekehrt. Darüber hinaus unterstreicht dies die Beobachtung, dass keine effiziente Adhärenz der HEK293 flRAGE Zellen an Laminin- oder Fibronectin-beschichtete sowie unbeschichtete Deckgläschen auftrat.

Die Beteiligung von RAGE an Adhärenz- und „Spreading“-Vorgängen lässt sich auch von Studien ableiten, die zeigen, dass die Interaktion von RAGE mit immobilisiertem Amphoterin in das Neuritenwachstum während der Gehirnentwicklung, was mit Zell-„Spreading“ vergleichbar ist, involviert ist (Hori et al. 1995; Huttunen et al. 2000; Srikrishna et al. 2002).

Die außergewöhnlich hohe und selektive Expression in gesundem Lungengewebe deutet darauf hin, dass die Verstärkung der Adhärenz und die Induktion von Zell-„Spreading“ entscheidende physiologische Funktionen von RAGE in der Lunge darstellen. AT I Zellen, die mit mehr als 95 % einen Großteil der Alveolaroberfläche bedecken, weisen einen dünnen expansiven Phänotyp auf, der den effektiven Gasaustausch ermöglicht. Das extensive „Spreading“ bildet demnach die Voraussetzung für die AT I Zellfunktion. Die in dieser Arbeit gezeigte präferentielle Interaktion von RAGE mit Kollagen IV, einer Hauptkomponente der Alveolarbasalmembran, könnte maßgeblich zu dieser funktionellen Morphologie der AT I Zellen beitragen und somit sowohl die Homöostase in der Lunge aufrechterhalten als auch einen effektiven Gasaustausch gewährleisten.

Die Auswertung dieser Ergebnisse verleitet dazu, das Akronym RAGE, das bisher für „**R**eceptor for **A**dvanced **G**lycation **E**ndproducts“ stand, jetzt als „**R**eceptor for **A**dherence and **G**reat Cell **E**xtension“ zu interpretieren, um der Bedeutung der hier erstmals beschriebenen, bisher unbekannten Funktion von RAGE Rechnung zu tragen.

4.5 Ausblick: Bedeutung der RAGE-vermittelten Adhärenz und des „Spreading“ für die Lungenfunktion

Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse können die bisher beschriebenen RAGE-Liganden-Interaktionen nicht unterstützen. Sie bedeuten viel mehr einen Paradigmenwechsel bei der Beurteilung der physiologischen Funktion von RAGE.

Um die Relevanz von RAGE als „Spreading“-Faktor der AT I Zellen weiter untermauern zu können, müssen die im Zellkulturmodell mit HEK293 flRAGE-transfizierten Zellen erlangten Daten erweitert werden. Neben der eindeutig gezeigten spezifischen Interaktion von RAGE mit Kollagenstrukturen und dem Ausschluss der Interaktion mit Fibronectin und Laminin müssen die Untersuchungen auf weitere Matrixkomponenten, wie z.B. Entactin und Perlecan ausgeweitet werden. Auch wenn mit diesem System eine gewisse RAGE-Abhängigkeit dadurch bewiesen wird, dass HEK293 wt Zellen oder mock-transfizierte Zellen weder in der Adhärenz noch im Zell-„Spreading“ beeinflusst werden, soll der durch die Transfektion mit flRAGE erzielte Effekt in den nativ RAGE-exprimierenden AT I Zellen untersucht werden. Die *in vitro* kultivierten und differenzierten AT I-ähnlichen Zellen bieten die Möglichkeit, die Inhibierung der Adhärenz oder des „Spreading“ in Anwesenheit von anti-RAGE-Reagenzien oder sRAGE zu analysieren, wobei hier der Einfluss von RAGE nur indirekt gezeigt werden kann. Eine elegante Methode stellt die RNAi Technik dar (Matzke and Birchler 2005), bei der durch Transfektion von si (small interfering) RNAs die RAGE-Expression post-transkriptional inhibiert werden kann. Ähnlich wie bei den flRAGE-transfizierten HEK293 Zellen ließe sich das Verhalten RAGE-positiver und RAGE-negativer Zellen direkt vergleichen. Als einschränkender Faktor erweist sich hier die aufwendige Isolationsprozedur und relativ schwierige Kultivierung der empfindlichen AT I Zellen. Beachtet werden muss auch, dass die *in vitro* Kultur sich doch erheblich von der normalen Lungenumgebung unterscheidet, so dass Veränderungen in der Morphologie und im Verhalten der isolierten Zellen nicht auszuschließen sind.

In vivo Untersuchungen in RAGE-KO-Mäusen (Chavakis et al. 2003; Liliensiek et al. 2004) lieferten zunächst den überraschenden Befund, dass die Tiere vital waren und einen normalen Lungenaufbau und eine normale Lungenfunktion aufwiesen. Die Bedeutung von RAGE für die Lungenfunktion und die Homöostase wird allerdings durch Untersuchungen adulter Tiere deutlich, die im Laufe der Zeit einen fibrotischen Phänotyp und in erhöhtem Maße Tumore entwickeln (Kasper et al. 2003). Um zu

umgehen, dass bei Ausschalten des *RAGE*-Gens während der Embryonalentwicklung andere Moleküle die Funktion von RAGE substituieren, und somit die Rolle von RAGE nicht eindeutig zu bestimmen ist, muss die RAGE-Expression experimentell in juvenilen oder adulten Tieren z.B. durch ein selektives „Cre Knock-Out-System“ herunterreguliert werden. Bei diesem System wird die Cre Rekombinase des Bakteriophagen P1 eingesetzt, die die Rekombination, bzw. das Herausschneiden der DNA zwischen zwei *loxP* Erkennungssequenzen katalysiert (Nagy 2000). Hierfür müssen sowohl zwei *loxP* Zielsequenzen in einem essentiellen Teil des Zielgens, in diesem Fall *RAGE*, der Zellen eingeführt werden, sowie die induzierbare Expression der Cre Rekombinase erreicht werden. Dieses System, bei dem auch gewebe- oder zellspezifische Manipulationen der Genexpression erzielt werden können, würde auch zur Klärung der Rolle von RAGE bei den beschriebenen pathologischen Situationen beitragen können.

5 Zusammenfassung

Unter den „Advanced Glycation Endproducts“ (AGEs) werden eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Moleküle zusammengefasst, die durch mehrstufige, komplexe Umlagerungen zwischen reduzierenden Zuckern und freien Aminogruppen von Proteinen (Maillard-Reaktion) entstehen. Bedingt durch die Verursachung signifikanter Nährwertverluste in Lebensmitteln kommt diesen modifizierten Produkten aus ernährungsphysiologischer Sicht eine erhebliche Bedeutung zu. Des Weiteren sind sie von medizinischer Relevanz, da die Anhäufung *in vivo* gebildeter AGEs mit dem Auftreten alters- und Diabetes-bedingter Folgeerkrankungen assoziiert ist. Beispiele sind die Artherosklerose, die Amyloidose sowie die Alzheimer-Erkrankung. Für die pathologische Wirkung von AGEs wurde ein vor allem auf Endothelzellen vorkommender Membranrezeptor, „Receptor for Advanced Glycation Endproducts“ (RAGE), verantwortlich gemacht, der durch die spezifische Bindung individueller Glykierungsprodukte identifiziert und charakterisiert wurde.

In der vorgelegten Arbeit wurde zunächst aufgrund der pathologischen Relevanz eine Strategie zur Konzeption eines „Biosensors“ für AGEs verfolgt. In einer interdisziplinären Zusammenarbeit mit dem Institut für Lebensmittelchemie der TU Dresden und dem Institut für Polymerforschung e.V. sollte RAGE auf anorganischen Trägern über polymere Dünnschichten immobilisiert werden, um ein Messsystem für AGEs in komplexen Matrices wie z. B. flüssigen Lebensmitteln und Blut zu generieren. Als Vorarbeiten hierfür wurden sowohl der membranständige Rezeptor (flRAGE) als auch löslicher RAGE (sRAGE) in Säugerzellen exprimiert und in zahlreichen Bindungs- und Funktionsanalysen getestet. Entgegen zahlreichen Publikationen verschiedener Arbeitsgruppen konnte hierbei weder eine spezifische Interaktion der AGE-modifizierten Proben mit dem membranständigen oder dem löslichen RAGE-Protein gezeigt werden, noch führten die AGEs zu einer pathologisch-relevanten Zellaktivierung über den membranständigen Rezeptor. Auch die auf Endothelzellen beschriebene Expression des Rezeptors ließ sich weder auf mRNA-Ebene durch „real-time“ RT-PCR-Analysen noch auf Protein-Ebene unter Einsatz neu generierter, hoch spezifischer monoklonaler Antikörper bestätigen. Dies traf sowohl bei der Analyse unbehandelter HUVEC als auch Zytokin- und CML-stimulierter HUVEC zu. Darüber hinaus zeigte sich bei der quantitativen

Untersuchung von entzündetem Gewebe (M. Crohn) mittels „real time“ RT-PCR keine Erhöhung der *RAGE*-Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe. Diese Ergebnisse warfen Zweifel an der grundlegenden Bedeutung von RAGE als proinflammatorischer Rezeptor in AGE-bedingten Krankheiten auf und stellten damit auch dessen Eignung für einen AGE-Biosensor in Frage. Da RAGE bisher vor allem über seine pathogenetische Rolle definiert wurde, rückte die Frage nach der physiologischen Funktion dieses Rezeptors in den Vordergrund. Die vergleichende Analyse der Expression von *RAGE* in verschiedenen gesunden Geweben mittels „real time“ RT-PCR ergab eine nahezu selektive Expression in Lungengewebe. Eine bedeutendere Rolle von AGEs in diesem Organ im Vergleich zu anderen Geweben ließ sich aus klinischen Beobachtungen nicht ableiten. Wichtige Anhaltspunkte für die Funktion von RAGE in der Lunge ergaben sich aus der selektiven Lokalisation des Rezeptors auf Alveolarepithelzellen Typ I (AT I) sowohl in Gefrierschnitten der Lunge als auch nach *in vitro*-Kultur von Lungenzellen. RAGE konnte als neuer, hoch spezifischer Marker für AT I-Zellen definiert werden. Diese ausdifferenzierten und langgestreckten AT I Zellen bilden zusammen mit den Endothelzellen des Alveolar-Kapillarnetzes und einer verschmolzenen Basalmembran die Blut-Luft-Schranke, an der mittels Diffusion der bidirektionale Gasaustausch stattfindet. Weiterhin konnte RAGE in Immunfluoreszenzfärbungen und elektronenmikroskopischen Analysen der basolateralen Membran der AT I Zellen zugeordnet werden. Diese Lokalisation führte zu der Hypothese, dass RAGE mit Komponenten der Basalmembran interagiert. Funktionsanalysen mit den fRAGE-transfizierten HEK293 Zellen demonstrierten, dass RAGE nicht nur die Adhärenz von Zellen an Kollagen IV, einer Hauptkomponente der Alveolar-Basalmembran, verstärkte, sondern dass dieser Rezeptor sehr effektiv das „Spreading“ von Zellen induzierte. Des Weiteren wurde eine bevorzugte Bindung von RAGE an Kollagenstrukturen festgestellt, da weder der membranständige Rezeptor noch sRAGE mit anderen Komponenten der Basalmembran wie Laminin oder Fibronectin interagierten. Die Kollagen-Bindung der RAGE-exprimierenden HEK293 Zellen resultierte in einem Phänotyp, der stark dem der dünnen, ausgedehnten AT I Zellen ähnelte. Dies lässt die Vermutung zu, dass die beobachtete präferentielle Interaktion von RAGE mit Kollagen IV maßgeblich zu der funktionellen Morphologie der AT I Zellen *in vivo* beitragen könnte, die die Voraussetzung für einen effektiven bidirektionalen Gasaustausch darstellt.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit wurde ein neuer, bisher unbeachteter Aspekt der Biologie des RAGE aufgedeckt, der vermutlich entscheidend zur phänotypischen Ausprägung und Funktion des normalen humanen Lungengewebes beiträgt.

6 Literaturverzeichnis

- Abel M, Ritthaler U, Zhang Y, Deng Y, Schmidt AM, Greten J, Sernau T, Wahl P, Andrassy K, Ritz E (1995) Expression of receptors for advanced glycosylated end-products in renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 10:1662-1667
- Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ (2000) HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* 165:2950-2954
- Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW (1986) Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 261:4889-4894
- Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, Orian A, Ciechanover A, Ben Neriah Y (1995) Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10599-10603
- Ames JM, Bailey RG, Mann J (1999) Analysis of furanone, pyranone, and new heterocyclic colored compounds from sugar-glycine model Maillard systems. *J Agric Food Chem* 47:438-443
- Anderson MM, Requena JR, Crowley JR, Thorpe SR, Heinecke JW (1999) The myeloperoxidase system of human phagocytes generates Nepsilon-(carboxymethyl)lysine on proteins: a mechanism for producing advanced glycation end products at sites of inflammation. *J Clin Invest* 104:103-113
- Anderson RG, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW (1992) Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* 255:410-411
- Andrews NC, Faller DV (1991) A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 19:2499
- Araki N, Higashi T, Mori T, Shibayama R, Kawabe Y, Kodama T, Takahashi K, Shichiri M, Horiuchi S (1995) Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Eur J Biochem* 230:408-415
- Aronson D, Rayfield EJ (2002) How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc Diabetol* 1:1
- Aurrand-Lions M, Johnson-Leger C, Imhof BA (2002) Role of interendothelial adhesion molecules in the control of vascular functions. *Vascul Pharmacol* 39:239-246

Baeuerle PA, Henkel T (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12:141-179

Bankston PW, Porter GA, Milici AJ, Palade GE (1991) Differential and specific labeling of epithelial and vascular endothelial cells of the rat lung by *Lycopersicon esculentum* and *Griffonia simplicifolia* I lectins. *Eur J Cell Biol* 54:187-195

Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, Kislinger T, Stern DM, Schmidt AM, De Caterina R (2002) Advanced glycation end products activate endothelium through signal-transduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation* 105:816-822

Beg AA, Baltimore D (1996) An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274:782-784

Bianchi ME, Beltrame M, Paonessa G (1989) Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG1. *Science* 243:1056-1059

Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP (1998) AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res* 37:586-600

Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, Wahl P, Ziegler R, Muller M, Nawroth PP (1997) Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 96:2262-2271

Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Kloting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Haring HU, Schleicher E, Nawroth PP (2001) Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 50:2792-2808

Bierhaus A, Zhang Y, Deng Y, Mackman N, Quehenberger P, Haase M, Luther T, Muller M, Bohrer H, Greten J, . (1995) Mechanism of the tumor necrosis factor alpha-mediated induction of endothelial tissue factor. *J Biol Chem* 270:26419-26432

Borok Z, Liebler JM, Lubman RL, Foster MJ, Zhou B, Li X, Zabski SM, Kim KJ, Crandall ED (2002) Na transport proteins are expressed by rat alveolar epithelial type I cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282:L599-L608

Borok Z, Lubman RL, Danto SI, Zhang XL, Zabski SM, King LS, Lee DM, Agre P, Crandall ED (1998) Keratinocyte growth factor modulates alveolar epithelial cell phenotype in vitro: expression of aquaporin 5. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:554-561

- Boulanger E, Wautier MP, Wautier JL, Boval B, Panis Y, Wernert N, Danze PM, Dequiedt P (2002) AGEs bind to mesothelial cells via RAGE and stimulate VCAM-1 expression. *Kidney Int* 61:148-156
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Brett J, Schmidt AM, Yan SD, Zou YS, Weidman E, Pinsky D, Nowygrod R, Neeper M, Przysiecki C, Shaw A (1993) Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues. *Am J Pathol* 143:1699-1712
- Brody JS, Williams MC (1992) Pulmonary alveolar epithelial cell differentiation. *Annu Rev Physiol* 54:351-371
- Brownlee M (1995) Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 46:223-234
- Brownlee M, Cerami A, Vlassara H (1988) Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 318:1315-1321
- Brownlee M, Pongor S, Cerami A (1983) Covalent attachment of soluble proteins by nonenzymatically glycosylated collagen. Role in the in situ formation of immune complexes. *J Exp Med* 158:1739-1744
- Bucala R, Tracey KJ, Cerami A (1991) Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 87:432-438
- Bulleid NJ, John DC, Kadler KE (2000) Recombinant expression systems for the production of collagen. *Biochem Soc Trans* 28:350-353
- Bunn HF, Gabbay KH, Gallop PM (1978) The glycosylation of hemoglobin: relevance to diabetes mellitus. *Science* 200:21-27
- Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinman H, Martin GR, Meneguzzi G, Paulsson M, Sanes J, . (1994) A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol* 14:209-211
- Campbell L, Hollins AJ, Al Eid A, Newman GR, von Ruhland C, Gumbleton M (1999) Caveolin-1 expression and caveolae biogenesis during cell transdifferentiation in lung alveolar epithelial primary cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 262:744-751

- Carlos TM, Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84:2068-2101
- Chavakis T, Bierhaus A, Al Fakhri N, Schneider D, Witte S, Linn T, Nagashima M, Morser J, Arnold B, Preissner KT, Nawroth PP (2003) The pattern recognition receptor (RAGE) is a counterreceptor for leukocyte integrins: a novel pathway for inflammatory cell recruitment. *J Exp Med* 198:1507-1515
- Cheek JM, Evans MJ, Crandall ED (1989) Type I cell-like morphology in tight alveolar epithelial monolayers. *Exp Cell Res* 184:375-387
- Coimbra A, Andrade C (1971) Familial amyloid polyneuropathy: an electron microscope study of the peripheral nerve in five cases. I. Interstitial changes. *Brain* 94:199-206
- Collison KS, Parhar RS, Saleh SS, Meyer BF, Kwaasi AA, Hammami MM, Schmidt AM, Stern DM, Al Mohanna FA (2002) RAGE-mediated neutrophil dysfunction is evoked by advanced glycation end products (AGEs). *J Leukoc Biol* 71:433-444
- Cortizo AM, Lettieri MG, Barrio DA, Mercer N, Etcheverry SB, McCarthy AD (2003) Advanced glycation end-products (AGEs) induce concerted changes in the osteoblastic expression of their receptor RAGE and in the activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK). *Mol Cell Biochem* 250:1-10
- Cowley S, Paterson H, Kemp P, Marshall CJ (1994) Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77:841-852
- Crapo JD, Barry BE, Gehr P, Bachofen M, Weibel ER (1982) Cell number and cell characteristics of the normal human lung. *Am Rev Respir Dis* 126:332-337
- Crouch EC (1996) *The Lung*. Lippincott-Raven, Philadelphia
- Cunningham AC, Kirby JA (1995) Regulation and function of adhesion molecule expression by human alveolar epithelial cells. *Immunology* 86:279-286
- Dahlin K, Mager EM, Allen L, Tigue Z, Goodglick L, Wadehra M, Dobbs L (2004) Identification of genes differentially expressed in rat alveolar type I cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31:309-316
- Danto SI, Shannon JM, Borok Z, Zabski SM, Crandall ED (1995) Reversible transdifferentiation of alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12:497-502
- Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, Muller S, Resnati M, Sanvito F, Arrigoni G, Bianchi ME (2001) The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMG1

- induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J Cell Biol* 152:1197-1206
- Dobbs LG, Gonzalez R, Matthay MA, Carter EP, Allen L, Verkman AS (1998) Highly water-permeable type I alveolar epithelial cells confer high water permeability between the airspace and vasculature in rat lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2991-2996
- Donato R (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33:637-668
- Dunsmore SE, Martinez-Williams C, Goodman RA, Rannels DE (1995) Composition of extracellular matrix of type II pulmonary epithelial cells in primary culture. *Am J Physiol* 269:L754-L765
- Ehrhardt C, Kim KJ, Lehr CM (2004) Isolation and culture of human alveolar epithelial cells. *Methods Mol Med* 107:207-216
- Ekblom P, Ekblom M, Fecker L, Klein G, Zhang HY, Kadoya Y, Chu ML, Mayer U, Timpl R (1994) Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro. *Development* 120:2003-2014
- Elbert KJ, Schafer UF, Schafers HJ, Kim KJ, Lee VH, Lehr CM (1999) Monolayers of human alveolar epithelial cells in primary culture for pulmonary absorption and transport studies. *Pharm Res* 16:601-608
- Esposito C, Gerlach H, Brett J, Stern D, Vlassara H (1989) Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties. *J Exp Med* 170:1387-1407
- Evans MJ, Cabral LJ, Stephens RJ, Freeman G (1975) Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂. *Exp Mol Pathol* 22:142-150
- Faist V, Muller C, Drusch S, Erbersdobler HF (2001) Selective fortification of lysinoalanine, fructoselysine and N epsilon-carboxymethyllysine in casein model systems. *Nahrung* 45:218-221
- Fehrenbach H (2001) Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res* 2:33-46
- Fehrenbach H, Kasper M, Tschernig T, Shearman MS, Schuh D, Muller M (1998) Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) exhibits highly differential cellular and subcellular localisation in rat and human lung. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 44:1147-1157

- Fielding PE, Fielding CJ (1996) Intracellular transport of low density lipoprotein derived free cholesterol begins at clathrin-coated pits and terminates at cell surface caveolae. *Biochemistry* 35:14932-14938
- Forbes B (2002) Pulmonary epithelial cell culture. *Methods Mol Biol* 188:65-75
- Fuchs S, Hollins AJ, Laue M, Schaefer UF, Roemer K, Gumbleton M, Lehr CM (2003) Differentiation of human alveolar epithelial cells in primary culture: morphological characterization and synthesis of caveolin-1 and surfactant protein-C. *Cell Tissue Res* 311:31-45
- Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, Rubartelli A (2002) The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 3:995-1001
- Goldmann T, Vollmer E, Gerdes J (2003) What's cooking? detection of important biomarkers in HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues eliminates the need for antigen retrieval. *Am J Pathol* 163:2638-2640
- Gonzalez R, Yang YH, Griffin C, Allen L, Tigue Z, Dobbs L (2005) Freshly isolated rat alveolar type I cells, type II cells, and cultured type II cells have distinct molecular phenotypes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L179-L189
- Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Nowygrod S, Wolf BM, Caliste X, Yan SF, Stern DM, Schmidt AM (2001) Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol* 159:513-525
- Griese M (1999) Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* 13:1455-1476
- Griffin WS, Sheng JG, Royston MC, Gentleman SM, McKenzie JE, Graham DI, Roberts GW, Mrak RE (1998) Glial-neuronal interactions in Alzheimer's disease: the potential role of a 'cytokine cycle' in disease progression. *Brain Pathol* 8:65-72
- Gugliucci A, Bendayan M (1995) Reaction of advanced glycation endproducts with renal tissue from normal and streptozotocin-induced diabetic rats: an ultrastructural study using colloidal gold cytochemistry. *J Histochem Cytochem* 43:591-600
- Hall A (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509-514
- Haller H, Drab M, Luft FC (1996) The role of hyperglycemia and hyperinsulinemia in the pathogenesis of diabetic angiopathy. *Clin Nephrol* 46:246-255
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580

- Henle T (2001) Maillard reactions of food proteins: chemical, nutritional and functional aspects. *Nahrung* 45:149
- Henle T, Bachmann A (1996) Synthesis of pyrraline reference material. *Z Lebensm Unters Forsch* 202:72-74
- Hensley K, Carney JM, Mattson MP, Aksenova M, Harris M, Wu JF, Floyd RA, Butterfield DA (1994) A model for beta-amyloid aggregation and neurotoxicity based on free radical generation by the peptide: relevance to Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3270-3274
- Herz J, Willnow TE (1995) Lipoprotein and receptor interactions in vivo. *Curr Opin Lipidol* 6:97-103
- Hills BA (1999) An alternative view of the role(s) of surfactant and the alveolar model. *J Appl Physiol* 87:1567-1583
- Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, Neurath MF, Slaterry T, Beach D, McClary J, Nagashima M, Morser J, Stern D, Schmidt AM (1999) RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97:889-901
- Holmes DS, Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114:193-197
- Hori O, Brett J, Slaterry T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D (1995) The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphotericin in the developing nervous system. *J Biol Chem* 270:25752-25761
- Horvat R, Hovorka A, Dekan G, Poczewski H, Kerjaschki D (1986) Endothelial cell membranes contain podocalyxin--the major sialoprotein of visceral glomerular epithelial cells. *J Cell Biol* 102:484-491
- Hudson BG, Reenders ST, Tryggvason K (1993) Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem* 268:26033-26036
- Hudson BI, Bucciarelli LG, Wendt T, Sakaguchi T, Lalla E, Qu W, Lu Y, Lee L, Stern DM, Naka Y, Ramasamy R, Yan SD, Yan SF, D'Agati V, Schmidt AM (2003) Blockade of receptor for advanced glycation endproducts: a new target for therapeutic intervention in diabetic complications and inflammatory disorders. *Arch Biochem Biophys* 419:80-88
- Hui YY, McAmis WC, Baynes JW, Schaeffer RC, Jr., Wolf MB (2001) Effect of advanced glycation end products on oxidative stress in endothelial cells in culture:

- a warning on the use of cells studied in serum-free media. *Diabetologia* 44:1310-1317
- Huttunen HJ, Fages C, Rauvala H (1999) Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem* 274:19919-19924
- Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H (2000) Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem* 275:40096-40105
- Johnson MD, Widdicombe JH, Allen L, Barbry P, Dobbs LG (2002) Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium, supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1966-1971
- Junqueira L. (2002) *Basic Histology*, 10 edn. Appleton, Lange, Norwalk;Conn.
- Kapanci Y, Weibel ER, Kaplan HP, Robinson FR (1969) Pathogenesis and reversibility of the pulmonary lesions of oxygen toxicity in monkeys. II. Ultrastructural and morphometric studies. *Lab Invest* 20:101-118
- Kasper M, Bierhaus A, Nawroth PP. Pulmonary pathology of knockouts in mice lacking type I pneumocyte antigens. *Ann Anat* 185 (Suppl.), A144. 2003.
Ref Type: Abstract
- Kasper M, Reimann T, Hempel U, Wenzel KW, Bierhaus A, Schuh D, Dimmer V, Haroske G, Muller M (1998) Loss of caveolin expression in type I pneumocytes as an indicator of subcellular alterations during lung fibrogenesis. *Histochem Cell Biol* 109:41-48
- Kasper M, Singh G (1995) Epithelial lung cell marker: current tools for cell typing. *Histol Histopathol* 10:155-169
- Katsuoka F, Kawakami Y, Arai T, Imuta H, Fujiwara M, Kanma H, Yamashita K (1997) Type II alveolar epithelial cells in lung express receptor for advanced glycation end products (RAGE) gene. *Biochem Biophys Res Commun* 238:512-516
- Kawahara N, Tanaka T, Yokomizo A, Nanri H, Ono M, Wada M, Kohno K, Takenaka K, Sugimachi K, Kuwano M (1996) Enhanced coexpression of thioredoxin and high mobility group protein 1 genes in human hepatocellular carcinoma and the possible association with decreased sensitivity to cisplatin. *Cancer Res* 56:5330-5333

- Kim KJ, Malik AB (2003) Protein transport across the lung epithelial barrier. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284:L247-L259
- King H, Aubert RE, Herman WH (1998) Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. *Diabetes Care* 21:1414-1431
- Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du YS, Hofmann M, Yan SF, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM (1999) N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem* 274:31740-31749
- Koenig RJ, Peterson CM, Jones RL, Saudek C, Lehrman M, Cerami A (1976) Correlation of glucose regulation and hemoglobin A1c in diabetes mellitus. *N Engl J Med* 295:417-420
- Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497
- Koschinsky T, He CJ, Mitsuhashi T, Bucala R, Liu C, Buening C, Heitmann K, Vlassara H (1997) Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:6474-6479
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lander HM, Tauras JM, Ogiste JS, Hori O, Moss RA, Schmidt AM (1997) Activation of the receptor for advanced glycation end products triggers a p21(ras)-dependent mitogen-activated protein kinase pathway regulated by oxidant stress. *J Biol Chem* 272:17810-17814
- Laurie GW, Leblond CP, Martin GR (1982) Localization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate proteoglycan, and fibronectin to the basal lamina of basement membranes. *J Cell Biol* 95:340-344
- Lee JH, Kaminski N, Dolganov G, Grunig G, Koth L, Solomon C, Erle DJ, Sheppard D (2001) Interleukin-13 induces dramatically different transcriptional programs in three human airway cell types. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25:474-485
- Leong KG, Karsan A (2000) Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor alpha. *Histol Histopathol* 15:1303-1325
- Li J, Qu X, Schmidt AM (1998) Sp1-binding elements in the promoter of RAGE are essential for amphotericin-mediated gene expression in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 273:30870-30878

- Li J, Schmidt AM (1997) Characterization and functional analysis of the promoter of RAGE, the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 272:16498-16506
- Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, He C, Banerjee D, Vlassara H (1996) Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:11047-11052
- Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M, Hofer S, Plachky J, Grone HJ, Kurschus FC, Schmidt AM, Yan SD, Martin E, Schleicher E, Stern DM, Hammerling GG, Nawroth PP, Arnold B (2004) Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J Clin Invest* 113:1641-1650
- Liu L, Mul FP, Lutter R, Roos D, Knol EF (1996) Transmigration of human neutrophils across airway epithelial cell monolayers is preferentially in the physiologic basolateral-to-apical direction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15:771-780
- Liu Y, Dargusch R, Schubert D (1997) Beta amyloid toxicity does not require RAGE protein. *Biochem Biophys Res Commun* 237:37-40
- Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS (1999) Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem* 274:20071-20074
- MACKLIN CC (1954) The pulmonary alveolar mucoid film and the pneumonocytes. *Lancet* 266:1099-1104
- Magee T, Pirinen N, Adler J, Pagakis SN, Parmryd I (2002) Lipid rafts: cell surface platforms for T cell signaling. *Biol Res* 35:127-131
- Maillard LC (1912) Action des acides aminés sur les sucres. Formation des mélanoidines par voi méthodique. *C R Acad Ser* 154:66-68
- Makita Z, Vlassara H, Cerami A, Bucala R (1992) Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J Biol Chem* 267:5133-5138
- Makita Z, Yanagisawa K, Kuwajima S, Yoshioka N, Atsumi T, Hasunuma Y, Koike T (1995) Advanced glycation endproducts and diabetic nephropathy. *J Diabetes Complications* 9:265-268
- Malherbe P, Richards JG, Gaillard H, Thompson A, Diener C, Schuler A, Huber G (1999) cDNA cloning of a novel secreted isoform of the human receptor for advanced glycation end products and characterization of cells co-expressing cell-surface scavenger receptors and Swedish mutant amyloid precursor protein. *Brain Res Mol Brain Res* 71:159-170

- Marin M, Karis A, Visser P, Grosveld F, Philipsen S (1997) Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 89:619-628
- Mason CM, Guery BP, Summer WR, Nelson S (1996) Keratinocyte growth factor attenuates lung leak induced by alpha-naphthylthiourea in rats. *Crit Care Med* 24:925-931
- Matzke MA, Birchler JA (2005) RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet* 6:24-35
- May MJ, Ghosh S (1997) Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 8:63-73
- Merenmies J, Pihlaskari R, Laitinen J, Wartiovaara J, Rauvala H (1991) 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane. *J Biol Chem* 266:16722-16729
- Miranda LP, Tao T, Jones A, Chernushevich I, Standing KG, Geczy CL, Alewood PF (2001) Total chemical synthesis and chemotactic activity of human S100A12 (EN-RAGE). *FEBS Lett* 488:85-90
- Miyata T, Hori O, Zhang J, Yan SD, Ferran L, Iida Y, Schmidt AM (1996) The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a central mediator of the interaction of AGE-beta2microglobulin with human mononuclear phagocytes via an oxidant-sensitive pathway. Implications for the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis. *J Clin Invest* 98:1088-1094
- Monnier VM, Cerami A (1981) Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science* 211:491-493
- Monnier VM, Cerami A (1983) Detection of nonenzymatic browning products in the human lens. *Biochim Biophys Acta* 760:97-103
- Nagai N, Hosokawa M, Itohara S, Adachi E, Matsushita T, Hosokawa N, Nagata K (2000) Embryonic lethality of molecular chaperone hsp47 knockout mice is associated with defects in collagen biosynthesis. *J Cell Biol* 150:1499-1506
- Nagy A (2000) Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26:99-109
- Nathan DM, Meigs J, Singer DE (1997) The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: how sweet it is ... or is it? *Lancet* 350 Suppl 1:S14-S19

- Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A (1992) Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267:14998-15004
- Newman GR, Campbell L, von Ruhland C, Jasani B, Gumbleton M (1999) Caveolin and its cellular and subcellular immunolocalisation in lung alveolar epithelium: implications for alveolar epithelial type I cell function. *Cell Tissue Res* 295:111-120
- Nicholas TE (1996) Pulmonary surfactant: no mere paint on the alveolar wall. *Respirology* 1:247-257
- Normand IC, Olver RE, Reynolds EO, Strang LB (1971) Permeability of lung capillaries and alveoli to non-electrolytes in the foetal lamb. *J Physiol* 219:303-330
- Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, Nakayama H (2001) Cd36, a member of the class b scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 276:3195-3202
- Ombrellino M, Wang H, Ajemian MS, Talhouk A, Scher LA, Friedman SG, Tracey KJ (1999) Increased serum concentrations of high-mobility-group protein 1 in haemorrhagic shock. *Lancet* 354:1446-1447
- Panos RJ, Rubin JS, Csaky KG, Aaronson SA, Mason RJ (1993) Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor are heparin-binding growth factors for alveolar type II cells in fibroblast-conditioned medium. *J Clin Invest* 92:969-977
- Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ, Jr., Chow WS, Stern D, Schmidt AM (1998) Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med* 4:1025-1031
- Parkkinen J, Raulo E, Merenmies J, Nolo R, Kajander EO, Baumann M, Rauvala H (1993) Amphoterin, the 30-kDa protein in a family of HMG1-type polypeptides. Enhanced expression in transformed cells, leading edge localization, and interactions with plasminogen activation. *J Biol Chem* 268:19726-19738
- Passalacqua M, Zicca A, Sparatore B, Patrone M, Melloni E, Pontremoli S (1997) Secretion and binding of HMG1 protein to the external surface of the membrane are required for murine erythroleukemia cell differentiation. *FEBS Lett* 400:275-279
- Paulsson M (1992) Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27:93-127
- Phelps DS, Floros J (1991) Localization of pulmonary surfactant proteins using immunohistochemistry and tissue in situ hybridization. *Exp Lung Res* 17:985-995

- Pongor S, Ulrich PC, Bencsath FA, Cerami A (1984) Aging of proteins: isolation and identification of a fluorescent chromophore from the reaction of polypeptides with glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:2684-2688
- Rahbar S, Blumenfeld O, Ranney HM (1969) Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 36:838-843
- Rauvala H, Pihlaskari R (1987) Isolation and some characteristics of an adhesive factor of brain that enhances neurite outgrowth in central neurons. *J Biol Chem* 262:16625-16635
- Renard C, Chappey O, Wautier MP, Nagashima M, Lundh E, Morser J, Zhao L, Schmidt AM, Scherrmann JM, Wautier JL (1997) Recombinant advanced glycation end product receptor pharmacokinetics in normal and diabetic rats. *Mol Pharmacol* 52:54-62
- Renard P, Raes M (1999) The proinflammatory transcription factor NFkappaB: a potential target for novel therapeutical strategies. *Cell Biol Toxicol* 15:341-344
- Rendon-Mitchell B, Ochani M, Li J, Han J, Wang H, Yang H, Susarla S, Czura C, Mitchell RA, Chen G, Sama AE, Tracey KJ, Wang H (2003) IFN-gamma induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism. *J Immunol* 170:3890-3897
- Ridge KM, Rutschman DH, Factor P, Katz AI, Bertorello AM, Sznajder JL (1997) Differential expression of Na-K-ATPase isoforms in rat alveolar epithelial cells. *Am J Physiol* 273:L246-L255
- Ritthaler U, Deng Y, Zhang Y, Greten J, Abel M, Sido B, Allenberg J, Otto G, Roth H, Bierhaus A (1995) Expression of receptors for advanced glycation end products in peripheral occlusive vascular disease. *Am J Pathol* 146:688-694
- Rosseau S, Selhorst J, Wiechmann K, Leissner K, Maus U, Mayer K, Grimminger F, Seeger W, Lohmeyer J (2000) Monocyte migration through the alveolar epithelial barrier: adhesion molecule mechanisms and impact of chemokines. *J Immunol* 164:427-435
- Roth J, Taatjes DJ, Tokuyasu KT (1990) Contrasting of Lowicryl K4M thin sections. *Histochemistry* 95:123-136
- Rouhiainen A, Kuja-Panula J, Wilkman E, Pakkanen J, Stenfors J, Tuominen RK, Lepantalo M, Carpen O, Parkkinen J, Rauvala H (2004) Regulation of monocyte migration by amphoterin (HMGB1). *Blood* 104:1174-1182
- Sakurai S, Yonekura H, Yamamoto Y, Watanabe T, Tanaka N, Li H, Rahman AK, Myint KM, Kim CH, Yamamoto H (2003) The AGE-RAGE system and diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14:S259-S263

- Sanchez-Mejorada G, Rosales C (1998) Fcγ receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras. *J Biol Chem* 273:27610-27619
- Sannes PL (1984) Differences in basement membrane-associated microdomains of type I and type II pneumocytes in the rat and rabbit lung. *J Histochem Cytochem* 32:827-833
- Santana C, Noris G, Espinoza B, Ortega E (1996) Protein tyrosine phosphorylation in leukocyte activation through receptors for IgG. *J Leukoc Biol* 60:433-440
- Sasaki N, Toki S, Chowei H, Saito T, Nakano N, Hayashi Y, Takeuchi M, Makita Z (2001) Immunohistochemical distribution of the receptor for advanced glycation end products in neurons and astrocytes in Alzheimer's disease. *Brain Res* 888:256-262
- Satoh H, Togo M, Hara M, Miyata T, Han K, Maekawa H, Ohno M, Hashimoto Y, Kurokawa K, Watanabe T (1997) Advanced glycation endproducts stimulate mitogen-activated protein kinase and proliferation in rabbit vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 239:111-115
- Schade AE, Levine AD (2004) Cutting edge: extracellular signal-regulated kinases 1/2 function as integrators of TCR signal strength. *J Immunol* 172:5828-5832
- Schafer BW, Heizmann CW (1996) The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 21:134-140
- Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG (1997) Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* 99:457-468
- Schmidt AM, Hasu M, Popov D, Zhang JH, Chen J, Yan SD, Brett J, Cao R, Kuwabara K, Costache G (1994a) Receptor for advanced glycation end products (AGEs) has a central role in vessel wall interactions and gene activation in response to circulating AGE proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8807-8811
- Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D (1994b) Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb* 14:1521-1528
- Schmidt AM, Hori O, Chen JX, Li JF, Crandall J, Zhang J, Cao R, Yan SD, Brett J, Stern D (1995a) Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J Clin Invest* 96:1395-1403

- Schmidt AM, Mora R, Cao R, Yan SD, Brett J, Ramakrishnan R, Tsang TC, Simionescu M, Stern D (1994c) The endothelial cell binding site for advanced glycation end products consists of a complex: an integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide. *J Biol Chem* 269:9882-9888
- Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W, Clauss M (1992) Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 267:14987-14997
- Schmidt AM, Yan SD, Brett J, Mora R, Nowygrod R, Stern D (1993) Regulation of human mononuclear phagocyte migration by cell surface-binding proteins for advanced glycation end products. *J Clin Invest* 91:2155-2168
- Schmidt AM, Yan SD, Stern DM (1995b) The dark side of glucose. *Nat Med* 1:1002-1004
- Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D (1999) Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 84:489-497
- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM (2000) The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim Biophys Acta* 1498:99-111
- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM (2001) The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 108:949-955
- Schnittler HJ, Wilke A, Gress T, Suttrop N, Drenckhahn D (1990) Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J Physiol* 431:379-401
- Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J (1994) Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 127:1217-1232
- Schwenger V, Zeier M, Henle T, Ritz E (2001) Advanced glycation endproducts (AGEs) as uremic toxins. *Nahrung* 45:172-176
- Selkoe DJ (2001) Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* 32:177-180
- Sell DR, Monnier VM (1989) Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem* 264:21597-21602

- Sell DR, Nagaraj RH, Grandhee SK, Odetti P, Lapolla A, Fogarty J, Monnier VM (1991) Pentosidine: a molecular marker for the cumulative damage to proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes Metab Rev* 7:239-251
- Shaw SM, Crabbe MJ (1994) Non-specific binding of advanced-glycosylation end-products to macrophages outweighs specific receptor-mediated interactions. *Biochem J* 304 (Pt 1):121-129
- Shirasawa M, Fujiwara N, Hirabayashi S, Ohno H, Iida J, Makita K, Hata Y (2004) Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells. *Genes Cells* 9:165-174
- Simm A, Bartling B, Silber RE (2004) RAGE: a new pleiotropic antagonistic gene? *Ann N Y Acad Sci* 1019:228-231
- Simm A, Munch G, Seif F, Schenk O, Heidland A, Richter H, Vamvakas S, Schinzel R (1997) Advanced glycation endproducts stimulate the MAP-kinase pathway in tubulus cell line LLC-PK1. *FEBS Lett* 410:481-484
- Sims TJ, Rasmussen LM, Oxlund H, Bailey AJ (1996) The role of glycation cross-links in diabetic vascular stiffening. *Diabetologia* 39:946-951
- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44:129-146
- Sligh JE, Jr., Ballantyne CM, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, Bradley A, Beaudet AL (1993) Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8529-8533
- Smith MA, Taneda S, Richey PL, Miyata S, Yan SD, Stern D, Sayre LM, Monnier VM, Perry G (1994) Advanced Maillard reaction end products are associated with Alzheimer disease pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5710-5714
- Sommer A. Synthese und Charakterisierung von AGE-modifizierten Proteinen. 2003. Institut für Lebensmittelchemie, TU Dresden.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffiths JC, Romano G, Kingsman SM, Kingsman AJ (1995) A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* 23:628-633
- Soulis T, Thallas V, Youssef S, Gilbert RE, McWilliam BG, Murray-McIntosh RP, Cooper ME (1997) Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. *Diabetologia* 40:619-628

- Sousa MM, Du YS, Fernandes R, Guimaraes A, Stern D, Saraiva MJ (2001) Familial amyloid polyneuropathy: receptor for advanced glycation end products-dependent triggering of neuronal inflammatory and apoptotic pathways. *J Neurosci* 21:7576-7586
- Springer TA (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76:301-314
- Srikrishna G, Huttunen HJ, Johansson L, Weigle B, Yamaguchi Y, Rauvala H, Freeze HH (2002) N -Glycans on the receptor for advanced glycation end products influence amphotericin binding and neurite outgrowth. *J Neurochem* 80:998-1008
- Srikrishna G, Panneerselvam K, Westphal V, Abraham V, Varki A, Freeze HH (2001) Two proteins modulating transendothelial migration of leukocytes recognize novel carboxylated glycans on endothelial cells. *J Immunol* 166:4678-4688
- Stern D, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM (2002) Receptor for advanced glycation endproducts: a multiligand receptor magnifying cell stress in diverse pathologic settings. *Adv Drug Deliv Rev* 54:1615-1625
- Sugahara K, Rubin JS, Mason RJ, Aronsen EL, Shannon JM (1995) Keratinocyte growth factor increases mRNAs for SP-A and SP-B in adult rat alveolar type II cells in culture. *Am J Physiol* 269:L344-L350
- Sugaya K, Fukagawa T, Matsumoto K, Mita K, Takahashi E, Ando A, Inoko H, Ikemura T (1994) Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics* 23:408-419
- Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T, . (1997) A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386:292-296
- Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, Tanji N, Lu Y, Lalla E, Fu C, Hofmann MA, Kislinger T, Ingram M, Lu A, Tanaka H, Hori O, Ogawa S, Stern DM, Schmidt AM (2000) Blockade of RAGE-amphotericin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 405:354-360
- Tanaka N, Yonekura H, Yamagishi S, Fujimori H, Yamamoto Y, Yamamoto H (2000) The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor- α through nuclear factor- κ B, and by 17 β -estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 275:25781-25790

- Tarentino AL, Plummer TH (1987) Peptide-N4-(N-acetyl-beta-glucosaminy) asparagine amidase and endo-beta-N-acetylglucosaminidase from *Flavobacterium meningosepticum*. *Methods Enzymol* 138:770-778
- Tate CG, Haase J, Baker C, Boorsma M, Magnani F, Vallis Y, Williams DC (2003) Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter. *Biochim Biophys Acta* 1610:141-153
- Taylor AE, Gaar KA, Jr. (1970) Estimation of equivalent pore radii of pulmonary capillary and alveolar membranes. *Am J Physiol* 218:1133-1140
- Temme A, Rieger M, Reber F, Lindemann D, Weigle B, Diestelkoetter-Bachert P, Ehninger G, Tatsuka M, Terada Y, Rieber EP (2003) Localization, dynamics, and function of survivin revealed by expression of functional survivinDsRed fusion proteins in the living cell. *Mol Biol Cell* 14:78-92
- Thiele KE. Perpetuierung chronisch entzündlicher Reaktionen am Beispiel von Morbus Crohn. 2000.
Ref Type: Thesis/Dissertation
- Thornalley PJ (1998) Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 44:1013-1023
- Thornalley PJ (2002a) Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. *Int Rev Neurobiol* 50:37-57
- Thornalley PJ (2002b) Methods for studying the binding of advanced glycated proteins to receptors for advanced glycation endproducts (AGE receptors). *Methods Mol Biol* 196:49-62
- Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS (1999) Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem J* 344 Pt 1:109-116
- Timpl R (1989) Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem* 180:487-502
- Timpl R, Wiedemann H, van D, V, Furthmayr H, Kuhn K (1981) A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem* 120:203-211
- Uhal BD (1997) Cell cycle kinetics in the alveolar epithelium. *Am J Physiol* 272:L1031-L1045

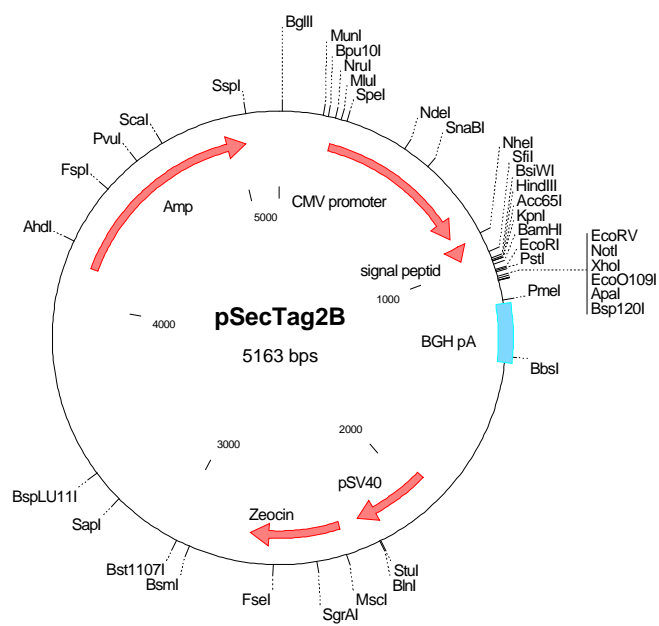
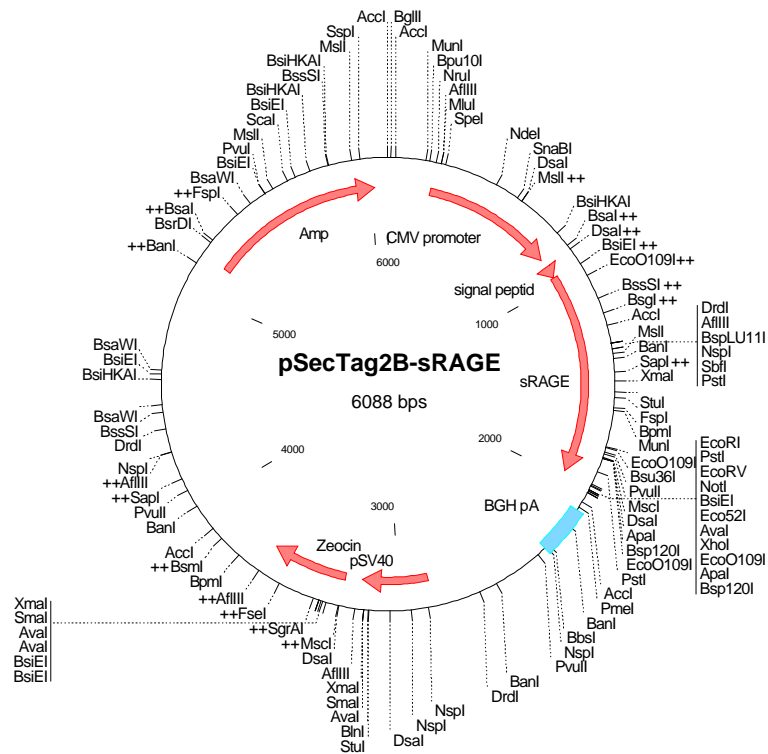
- Ulich TR, Yi ES, Longmuir K, Yin S, Biltz R, Morris CF, Housley RM, Pierce GF (1994) Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes in vivo. *J Clin Invest* 93:1298-1306
- Valencia JV, Mone M, Koehne C, Rediske J, Hughes TE (2004a) Binding of receptor for advanced glycation end products (RAGE) ligands is not sufficient to induce inflammatory signals: lack of activity of endotoxin-free albumin-derived advanced glycation end products. *Diabetologia* 47:844-852
- Valencia JV, Mone M, Zhang J, Weetall M, Buxton FP, Hughes TE (2004b) Divergent pathways of gene expression are activated by the RAGE ligands S100b and AGE-BSA. *Diabetes* 53:743-751
- Valencia JV, Weldon SC, Quinn D, Kiers GH, DeGroot J, TeKoppele JM, Hughes TE (2004c) Advanced glycation end product ligands for the receptor for advanced glycation end products: biochemical characterization and formation kinetics. *Anal Biochem* 324:68-78
- Vissing H, Aagaard L, Tommerup N, Boel E (1994) Localization of the human gene for advanced glycosylation end product-specific receptor (AGER) to chromosome 6p21.3. *Genomics* 24:606-608
- Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowicz D, Yang Z, Liu FT, Cerami A (1995) Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE): a new member of the AGE-receptor complex. *Mol Med* 1:634-646
- Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ (1999) HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 285:248-251
- Wang H, Yang H, Tracey KJ (2004) Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med* 255:320-331
- Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM, Anderson GM, Hori O, Zoukourian C, Capron L, Chappey O, Yan SD, Brett J (1994) Advanced glycation end products (AGEs) on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between surface-associated AGEs and diabetic complications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7742-7746
- Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, Hori O, Stern D, Schmidt AM (1996) Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest* 97:238-243

- Weibel ER (1971) The mystery of "non-nucleated plates" in the alveolar epithelium of the lung explained. *Acta Anat (Basel)* 78:425-443
- Weibel ER (1988) *Pulmonary Diseases and Disorders*. pp. 11-61
- Wendt T, Tanji N, Guo J, Hudson BI, Bierhaus A, Ramasamy R, Arnold B, Nawroth PP, Yan SF, D'Agati V, Schmidt AM (2003) Glucose, glycation, and RAGE: implications for amplification of cellular dysfunction in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14:1383-1395
- Wenzel E, Tasto S, Erbersdobler HF, Faist V (2002) Effect of heat-treated proteins on selected parameters of the biotransformation system in the rat. *Ann Nutr Metab* 46:9-16
- Williams MC (2003) Alveolar type I cells: molecular phenotype and development. *Annu Rev Physiol* 65:669-695
- Williamson JR, Chang K, Tilton RG, Prater C, Jeffrey JR, Weigel C, Sherman WR, Eades DM, Kilo C (1987) Increased vascular permeability in spontaneously diabetic BB/W rats and in rats with mild versus severe streptozocin-induced diabetes. Prevention by aldose reductase inhibitors and castration. *Diabetes* 36:813-821
- Xiang YY, Wang DY, Tanaka M, Suzuki M, Kiyokawa E, Igarashi H, Naito Y, Shen Q, Sugimura H (1997) Expression of high-mobility group-1 mRNA in human gastrointestinal adenocarcinoma and corresponding non-cancerous mucosa. *Int J Cancer* 74:1-6
- Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H, Yamamoto Y, Yamamoto H (1998) Advanced glycation endproducts inhibit prostacyclin production and induce plasminogen activator inhibitor-1 in human microvascular endothelial cells. *Diabetologia* 41:1435-1441
- Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Katsuno K, Sato F, Mita I, Ooka H, Satozawa N, Kawakami T, Nomura M, Yamamoto H (1997) Advanced glycation end products-driven angiogenesis in vitro. Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 272:8723-8730
- Yamamoto Y, Kato I, Doi T, Yonekura H, Ohashi S, Takeuchi M, Watanabe T, Yamagishi S, Sakurai S, Takasawa S, Okamoto H, Yamamoto H (2001) Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. *J Clin Invest* 108:261-268
- Yamamoto Y, Yamagishi S, Yonekura H, Doi T, Tsuji H, Kato I, Takasawa S, Okamoto H, Abedin J, Tanaka N, Sakurai S, Migita H, Unoki H, Wang H, Zenda T, Wu PS, Segawa Y, Higashide T, Kawasaki K, Yamamoto H (2000) Roles of the AGE-RAGE system in vascular injury in diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 902:163-170

- Yan SD, Chen X, Fu J, Chen M, Zhu H, Roher A, Slattery T, Zhao L, Nagashima M, Morser J, Migheli A, Nawroth P, Stern D, Schmidt AM (1996) RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 382:685-691
- Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D (1994) Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269:9889-9897
- Yan SD, Zhu H, Zhu A, Golabek A, Du H, Roher A, Yu J, Soto C, Schmidt AM, Stern D, Kindy M (2000) Receptor-dependent cell stress and amyloid accumulation in systemic amyloidosis. *Nat Med* 6:643-651
- Yang Z, Makita Z, Horii Y, Brunelle S, Cerami A, Sehajpal P, Suthanthiran M, Vlassara H (1991) Two novel rat liver membrane proteins that bind advanced glycosylation endproducts: relationship to macrophage receptor for glucose-modified proteins. *J Exp Med* 174:515-524
- Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjercke RJ, Juhasz O, Crow MT, Tilton RG, Denner L (2001) Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor-kappaB transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes* 50:1495-1504
- Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, Yamamoto H (2003) Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J* 370:1097-1109
- Yurchenco PD, O'Rear JJ (1994) Basal lamina assembly. *Curr Opin Cell Biol* 6:674-681
- Zill H, Bek S, Hofmann T, Huber J, Frank O, Lindenmeier M, Weigle B, Erbersdobler HF, Scheidler S, Busch AE, Faist V (2003) RAGE-mediated MAPK activation by food-derived AGE and non-AGE products. *Biochem Biophys Res Commun* 300:311-315
- Zill H, Gunther R, Erbersdobler HF, Folsch UR, Faist V (2001) RAGE expression and AGE-induced MAP kinase activation in Caco-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 288:1108-1111
- Zimmet PZ, Alberti KG (1997) The changing face of macrovascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus: an epidemic in progress. *Lancet* 350 Suppl 1:S11-S14

7 Anhang

Vektorkarte: pSecTag2B-sRAGE und Ausgangsvektor



Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Professor Dr. E. Peter Rieber, der es mir ermöglichte, an diesem wahrlich „aufregenden“ Thema in seinem Institut zu arbeiten. Er war dabei für mich nicht nur ein kritischer Gutachter meiner Ergebnisse, sondern er nahm sich immer wieder die Zeit, um grundlegende Fragestellungen zu diskutieren und Lösungsstrategien zu entwickeln, gerade wenn „RAGE“ einen mal zur „Weißglut“ trieb. Ich bewundere sein enormes Fachwissen sowie seine große wissenschaftliche Kompetenz. Von den Erfahrungen, die ich während meiner Doktorarbeit in seinem Institut sammeln konnte, werde ich wohl zeitlebens profitieren.

Herzlich möchte ich mich auch bei Professor Dr. Gerhard Rödel bedanken, der den Fortgang dieser Arbeit mit großem Interesse verfolgt hat. Die Gespräche mit ihm regten stets dazu an, die Thematik auch mal von einem anderen Blickwinkel aus zu betrachten und somit neue Aspekte zu erörtern.

Die Basis für diese Arbeit wurde durch Vorarbeiten von Dr. Bernd Weigle geschaffen.

Durch die „seelische und moralische“ – und natürlich auch wissenschaftliche - Unterstützung meiner am Institut gewonnenen Freunde, Agnieszka, Annette und Michael war ich immer zuversichtlich, dass „wir es schaffen werden!“. Ich muss schon wieder schmunzeln, wenn ich an die vielen lustigen und schönen Momente denke, die wir innerhalb und außerhalb des Labors gemeinsam erlebt haben...

Bei allen Kolleginnen und Kollegen des Instituts für Immunologie möchte ich mich für die herzliche Aufnahme und die große Hilfsbereitschaft im Laboralltag bedanken.

Großer Dank gilt auch Professor Michael Kasper, Dr. Lilla Knels und Dr. Carsten Ehrhardt, die mir ihre Erfahrungen auf dem Gebiet der Lunge zuteil werden ließen.

Meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern, danke ich von Herzen, dass sie mir diese Ausbildung ermöglicht haben. Ihre Liebe und ihr Vertrauen haben mich auf meinem gesamten Lebensweg begleitet. Danke, dass ihr immer für mich da seid und mir so großartige Perspektiven bietet!

Ohne den treuen Beistand und die liebevolle Unterstützung Christophers wäre ich wohl nie dazu gekommen, diese Zeilen zu schreiben! Danke, dass Du immer zu mir gehalten hast und mich immer wieder aufgebaut hast!

Versicherung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Immunologie der Technischen Universität Dresden unter wissenschaftlicher Betreuung von Prof. Dr. med. habil. E. P. Rieber angefertigt.

Die Promotionsordnung wird anerkannt.

Dresden, den 27.04.2005

Nina Demling